

UNIVERSITE PARIS 13 – ECOLE DOCTORALE GALILEE

UFR SANTE MEDECINE BIOLOGIE HUMAINE

N° attribué par la bibliothèque

THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le 22 Février 2016 par

Olivier BERNARD

CARACTERISATION DE L'EFFET CYTOPROTECTEUR DES CELLULES
SOUCHES MESENCHYMATEUSES SUR L'APOPTOSE ET SUR LES ALTERATIONS
PHENOTYPIQUES DES CELLULES EPITHELIALES ALVEOLAIRES SOUMISES A
L'HYPOXIE

Directeur de thèse : **Pr Carole Planès**

Co-directeur de thèse : **Dr Nicolas Dard**

Composition du jury

Dr Nadine Varin-Blank	Présidente
Pr Philippe Bonniaud	Rapporteur
Dr Sophie Lanone	Rapporteur
Dr Christophe Guignabert	Examineur
Dr Nicolas Dard	Co-directeur
Pr Carole Planès	Directeur

Laboratoire EA2363, « Hypoxie et Poumon »

Je tiens en premier lieu à remercier les différents membres de mon jury, le Docteur Nadine Varin-Blank, le Professeur Philippe Bonniaud, le Docteur Sophie Lanone et le Docteur Christophe Guignabert pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également le Pr Jean-Paul Richalet pour m'avoir accueilli, jeune M2 que j'étais, au sein du laboratoire, au sein duquel j'ai pu poursuivre mes travaux en thèse.

Chère Carole, merci, merci de m'avoir accompagné pendant ces 4 années, merci d'avoir été présente pour diriger ce travail, du début à la fin, merci de ton soutien infaillible lors de la préparation de mes différentes présentations orales notamment. Ton regard critique est toujours bienveillant et bienvenu. J'espère que nos chemins se recroiseront dans le futur.

Nicolas, merci de m'avoir encadré depuis ce M2. Merci de m'avoir enseigné les techniques de laboratoire avec beaucoup de rigueur. J'ai apprécié ce niveau d'exigence au quotidien. Un grand merci également pour m'avoir accompagné lors de l'écriture de la thèse, pour toutes tes remarques et critiques, toujours pertinentes et toujours dans un souci d'améliorer le résultat final. Je garderai cette rigueur et tes conseils précieusement en mémoire.

Emilie...j'aurai tellement de choses à dire que je ne saurai les retranscrire en quelques lignes...merci pour ta présence au quotidien. Merci de m'avoir donné cette opportunité d'enseigner, merci pour toutes tes idées, pour les nombreuses discussions que nous avons eu, pour toutes les initiatives que tu prends au labo également. J'espère que ton dynamisme continuera d'être contagieux, les effets secondaires n'en sont qu'agréables !

Florine, à ton tour ! Malgré la séparation de nos bureaux sur la fin, je dois dire que nous avons passé de bon moments, au labo, en congrès, en dehors aussi. Tu es pleine de vie, tu aimes la bonne musique (allez, dédicace à JLL !), le bon vin...bref, t'es bien plus qu'une collègue de boulot, mais ça tu le sais déjà, hein ?

Tomtom, Floflo, Momo, Cécile, mes médecins chercheurs préférés, merci pour votre bonne humeur, votre joie de vivre. Parfois j'en serai presque jaloux. Pour reprendre l'expression d'un illustre docteur, vous être « brillants » !

Merci Yurdagül de m'avoir fait partager ton projet de recherche.

Merci à tous les membres du laboratoire, Nicolas, Patricia, Dominique, Nadia, M. le doyen Aurélien, François, Eric, Michèle, Eva et Valérie, pour votre aide et votre soutien au quotidien, pour m'avoir fait découvrir l'escalade, le triathlon, les CO...~~de vrais sports comparés au ping-pong~~ ! J'ai été ravi de travailler en présence de nombreux étudiants, du

DUT au M2. Merci particulièrement Rabab pour ton aide précieuse, j'espère que tu continueras dans la voie de la recherche ! Bravo également à toi Adnan, bonne continuation quoi que tu fasses.

Merci aux étudiants des autres équipes du bâtiment SMBH que j'ai côtoyé avec grand plaisir. Lamia, Benjamin, Anouchka, Maïssa, Nesha, Vanessa, Amena et tous les autres, mais aussi avec différents membres qui m'ont apporté leur aide matériel et technique, ainsi que leurs conseils avisés, Lionel, Roxane, Erwan Guénin et Erwan Guyot, Angela, Denis.

Merci aux membres de l'IUT, particulièrement Dragana et Bleuenn, pour leur aide et leur bonne humeur. Ne changez pas !

Une pensée pour les personnes qui m'ont accueilli lors de mon premier stage de recherche en licence. Ce fut important pour moi de connaître ce monde du laboratoire avant de poursuivre en master. Si j'ai poursuivi, c'est en partie grâce à vous. Merci Liliane, Benoît, et au Pr JB Michel.

Un grand merci à mes amis du club de tennis de table de Charenton, plus particulièrement aux membres de mon équipe, Daniel, Laurent, Julien et Nicolas. J'ai eu cette chance de pouvoir concilier les études avec ma passion pour ce sport. Dix-neuf ans de tennis de table, mais toujours aussi passionné qu'au premier jour. J'espère qu'il en sera ainsi pour la recherche !

Merci à mes amis d'avoir été présent toutes ces années. Entre les week-ends au boulot et ceux pris par le ping, il a parfois été difficile de se voir. Mais à charge de revanche, Cyril, Cynthia, Yoann et tous les autres ?

Merci à toi Vincent de m'avoir accueilli toutes ces années à Arnou ! On en a parcouru du chemin ensemble et dans nos vies respectives ! Je te souhaite le meilleur... aga...

Merci à ma famille, mes parents, mon frère. Dès mon enfance, vous avez éveillé chez moi cette curiosité qui ne m'a ensuite jamais quittée. Merci pour votre soutien infailible, encore plus pendant cette fin de thèse. Merci pour tout !

Enorme merci à ma Chinch (que dis-je, Dr Chinch !) pour l'ultime relecture de ce manuscrit !

Un dernier grand merci au Docteur Frédérique Bulle, mon encadrante de M1. Si j'ai poursuivi en thèse, c'est bien grâce à toi. Pour tout ce que tu m'as apporté, c'est à toi que je te dédie cette thèse.

A mes parents
Au Dr Férédiqne Bulle

“In summary, there are no small problems. Problems that appear small are large problems that are not understood. Nature is a harmonious mechanism where all parts, including those appearing to play a secondary role, cooperate in the functional whole. No one can predict their importance in the future. All natural arrangements, however capricious they may seem, have a function.”

—Santiago Ramón y Cajal, Advice for a young investigator, 1897

Avant-propos

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) sont deux maladies au pronostic sombre. Bien que ces pathologies soient étudiées depuis de nombreuses années, leurs physiopathologies demeurent incomplètement comprises. L'hypoxie, commune à ces deux pathologies, pourrait exercer des effets délétères sur les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) et ainsi compromettre la réparation efficace de l'épithélium alvéolaire et constituer un facteur aggravant. La FPI comme le SDRA ne présentent aucune thérapeutique efficace à ce jour, aussi il est important de mieux comprendre leur physiopathologie, afin de trouver de nouveaux moyens de traitements. Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, plusieurs études ont mis en évidence l'effet bénéfique de la thérapie cellulaire à base de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur divers modèles animaux d'agressions alvéolaires aiguës ou fibrosantes. Ces résultats prometteurs aboutissent aujourd'hui à l'apparition de tests cliniques chez l'Homme. Cependant, le rôle des CSM vis-à-vis des CEA « agressées » n'a été que très peu documenté. Il est important de comprendre avec précision l'effet protecteur apporté par les CSM sur les CEA, afin d'optimiser leur utilisation. En caractérisant l'effet cytoprotecteur des CSM, qui exercent au moins en grande partie leurs effets par voie paracrine, on peut espérer identifier les principaux facteurs impliqués afin de mettre au point une thérapie reposant sur l'utilisation d'un cocktail de facteurs recombinants, plutôt que sur l'administration de CSM.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif général de mieux comprendre la réponse des CEA soumises à l'hypoxie et de caractériser in vitro les effets protecteurs paracrines des CSM sur les CEA agressées. Cette étude a été menée d'une part dans un modèle d'hypoxie sévère et chronique conduisant à des altérations phénotypiques faisant penser à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et d'autre part dans un modèle d'hypoxie de courte durée entraînant l'apoptose des CEA. Nous avons ainsi cherché à comprendre dans quelle mesure les CSM pouvaient limiter les effets délétères d'une hypoxie alvéolaire.

Sommaire

Résumé	17
Liste des abréviations	19
Liste des figures.....	22
Introduction	25
1. Lésions et réparation de l'alvéole pulmonaire	25
1.1. L'appareil respiratoire.....	25
1.1.1. Mécanique de la respiration.....	25
1.1.2. Anatomie du poumon	26
1.1.3. L'alvéole pulmonaire.....	27
1.1.4. Fonctions de l'épithélium alvéolaire	29
1.1.4.1. L'hématose.....	29
1.1.4.2. La sécrétion du surfactant	30
1.1.4.3. Les transports ioniques et protéiques	31
1.2. La réparation physiologique de l'épithélium alvéolaire	33
1.2.1. Origines des lésions épithéliales.....	33
1.2.2. Conséquences des lésions épithéliales.....	34
1.2.3. Processus de réparation épithéliale et facteurs mis en jeu.....	34
1.2.3.1. La phase inflammatoire et migratoire	35
1.2.3.2. Phase de prolifération	35
1.2.3.3. Phase de de différenciation et restauration de l'intégrité de l'épithélium	36
1.3. Exemples d'évolutions pathologiques des lésions de l'épithélium alvéolaire.....	39
1.3.1. La fibrose pulmonaire idiopathique.....	39
1.3.1.1. Diagnostic et épidémiologie	39

1.3.1.2.	Histologie et physiopathologie	40
1.3.1.2.1.	Le défaut de réparation de l'épithélium respiratoire.....	41
1.3.1.2.2.	Une inflammation délétère.....	43
1.3.1.2.3.	Evolution de la maladie	44
1.3.1.3.	Facteurs de risque	45
1.3.1.4.	Traitements actuels	46
1.3.1.5.	Essais thérapeutiques et perspectives.....	47
1.3.2.	Le syndrome de détresse respiratoire aigüe.....	49
1.3.2.1.	Epidémiologie	49
1.3.2.2.	Histologie et physiopathologie	50
1.3.2.2.1.	La phase aiguë exsudative	51
1.3.2.2.2.	La phase proliférative	51
1.3.2.2.3.	La phase résolutive	52
1.3.2.3.	Facteurs de risque	53
1.3.2.4.	Traitements actuels	55
1.3.2.5.	Essais thérapeutiques	55
2.	Réponses cellulaires à l'hypoxie.....	57
2.1.	L'hypoxie.....	57
2.2.	Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF	59
2.2.1.	Régulation par la voie canonique	61
2.2.2.	Régulation par la voie non canonique	63
2.3.	L'hypoxie et la production d'espèces réactives à l'oxygène	64
2.3.1.	La chaîne respiratoire mitochondriale	64
2.3.2.	Production d'espèces réactives à l'oxygène par la mitochondrie.....	66
2.3.3.	Autres sources de production d'espèces réactives à l'oxygène	69
2.3.4.	Les défenses antioxydantes	69
2.3.4.1.	Les défenses antioxydantes enzymatiques.....	69

2.3.4.1.1.	Les superoxydes dismutases	70
2.3.4.1.2.	La glutathion peroxydase et les peroxyrédoxines	70
2.3.4.1.3.	La catalase.....	71
2.3.4.2.	Les défenses antioxydantes non enzymatiques.....	71
2.3.5.	Les dommages cellulaires induits par les espèces réactives à l’oxygène	73
2.3.5.1.	Peroxydation lipidique	73
2.3.5.2.	Dommages oxydatifs de l’ADN	73
2.3.5.3.	Modification des protéines.....	74
2.4.	Lien entre HIF et ROS	74
3.	Mort cellulaire et transformations phénotypiques des cellules épithéliales alvéolaires. Influence de l’hypoxie.....	77
3.1.	La mort cellulaire programmée ou apoptose	78
3.1.1.	Définition.....	78
3.1.2.	Caractéristiques de l’apoptose	78
3.1.3.	Rôle des caspases.....	78
3.1.4.	Les protéines inhibitrices de l’apoptose (IAP)	80
3.1.5.	La voie intrinsèque	81
3.1.5.1.	Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	83
3.1.5.2.	Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	85
3.1.6.	La voie extrinsèque.....	85
3.1.6.1.	Mécanisme	85
3.1.6.2.	Fas, Fas-L dans la FPI et le SDRA	86
3.1.7.	Rôle potentiel de l’hypoxie.....	86
3.2.	La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)	88
3.2.1.	Caractéristiques	88
3.2.2.	Les types de TEM.....	89
3.2.3.	Les mécanismes de la TEM.....	91

3.2.3.1.	Inducteurs de la TEM	91
3.2.3.2.	Répresseurs de la TEM	93
3.2.3.3.	Voies de signalisation	94
3.2.3.3.1.	Transduction du signal.....	94
3.2.3.3.2.	Les facteurs de transcription de la TEM.....	95
3.2.4.	La TEM dans les maladies pulmonaires.....	97
3.2.4.1.	La FPI	97
3.2.4.2.	Le SDRA.....	98
3.2.5.	Rôle potentiel de l'hypoxie.....	98
4.	Les cellules souches mésenchymateuses	101
4.1.	Les cellules souches mésenchymateuses chez l'Homme.....	101
4.2.	Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses.....	102
4.2.1.	Les marqueurs des CSM.....	102
4.2.2.	Capacité de différenciation	103
4.2.3.	Propriétés migratoires	104
4.2.4.	Propriétés sécrétoires	105
4.2.5.	Propriétés immunomodulatrices	106
4.2.5.1.	Effets antiprolifératifs	106
4.2.5.2.	Effets anti-inflammatoires	106
4.3.	Intérêt thérapeutique des CSM dans les pathologies respiratoires.....	108
4.3.1.	Effet anti-inflammatoire et anti-bactérien	108
4.3.2.	Effet anti-fibrosant et anti-remodelage pulmonaire.....	109
4.4.	Mécanismes d'action des CSM.....	110
4.4.1.	La greffe de cellules exogènes.....	110
4.4.2.	Sécrétion de facteurs solubles.....	110
4.4.3.	Sécrétion de microvésicules	111
4.4.4.	Transfert de matériel par contact cellulaire	112

4.5.	Utilisation des CSM en thérapie cellulaire	114
4.6.	Vigilance sur l'utilisation des CSM.....	114
5.	Hypothèse et objectifs du travail de thèse	117
6.	Effet des CSM sur les altérations phénotypiques induites par l'hypoxie chronique..	119
6.1.	Hypothèse de travail et objectifs.....	119
6.2.	Schéma de l'étude	161
6.3.	Résumé des résultats	162
6.4.	Discussion.....	163
6.4.1.	Critique et limite du modèle utilisé	163
6.4.2.	Influence de l'Hx chronique sur le phénotype des CEA	165
6.4.3.	Mécanismes de la TEM en hypoxie	166
6.4.3.1.	Rôle de l'hypoxie et implication de la voie HIF	166
6.4.3.2.	Autres facteurs de transcription impliqués dans la TEM.....	167
6.4.3.3.	Les facteurs pro-fibrosants.....	167
6.4.4.	Rôle paracrine des CSM.....	168
7.	Effet des CSM sur l'apoptose des CEA induite par l'hypoxie.....	171
7.1.	Hypothèse de travail et objectifs.....	171
7.2.	Schéma de l'étude	211
7.3.	Résumé des résultats	212
7.4.	Discussion.....	214
7.4.1.	Choix du support de culture	214
7.4.2.	Choix de la durée d'exposition à l'hypoxie	214
7.4.3.	Préparation du milieu conditionné de CSM	215
7.4.4.	Implication et modulation de la voie HIF	217
7.4.5.	Implication et modulation de la voie des ROS.....	219
7.4.6.	Le stress du réticulum endoplasmique	221
7.4.7.	Rôle paracrine des CSM.....	222

8. Discussion générale et perspectives	223
9. Références bibliographiques	228

Résumé

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de l'adulte constituent des affections sévères du poumon distal, avec un pronostic sombre pour les patients. A ce jour, aucun traitement n'est réellement efficace. De manière intéressante, une hypoxie alvéolaire est retrouvée dans ces pathologies.

La thérapie cellulaire utilisant des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) pourrait représenter un intérêt thérapeutique chez l'Homme. Cependant, leurs mécanismes d'action sont multiples et encore mal définis. Aussi, nous avons testé in vitro l'hypothèse selon laquelle les CSMh pourraient exercer un effet cytoprotecteur paracrine sur les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) soumises à l'hypoxie.

Dans une première étude, nous avons montré qu'une exposition prolongée à l'hypoxie telle que celle rencontrée au cours de la FPI induisait des modifications phénotypiques des CEA primaires de rat, évocatrices d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). On observe une perte progressive d'expression des marqueurs épithéliaux (TTF1, AQP5, ZO-1 et E-Cadhérine), couplée à l'apparition tardive de marqueurs mésenchymateux (α -SMA et Vimentine). Ces modifications phénotypiques s'accompagnent de l'expression dès les premières heures d'hypoxie de facteurs de transcription impliqués dans la TEM (SNAIL, TWIST1 et ZEB1) ou induits par l'hypoxie (HIF-1 α et HIF-2 α), et de protéines induisant la TEM (TGF- β 1 et CTGF). La co-culture des CEA avec des CSMh en fond de puits prévient les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie ainsi que l'expression des facteurs pro-TEM TWIST1, ZEB1, TGF- β 1 et CTGF. Cet effet bénéfique des CSM est en partie expliqué par la sécrétion d'un facteur de croissance épithélial, le KGF.

Dans une deuxième étude, nous avons confirmé que les CEA entraînent en apoptose en condition hypoxique, via l'induction de deux voies de signalisations hypoxiques pro-apoptotiques. D'une part, les facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF sont stabilisés, et une cible pro-apoptotique, Bnip3, est induite. D'autre part, l'hypoxie induit une accumulation d'espèces réactives à l'oxygène délétère pour la cellule, perturbant l'équilibre redox de la cellule, endommageant l'ADN, et conduisant à l'apoptose. Cette accumulation pourrait résulter notamment d'une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD, en hypoxie. Le manque d'oxygène entraîne également l'expression de CHOP, facteur de transcription pro-apoptotique impliqué dans le stress du réticulum endoplasmique, qui va

inhiber l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Nous avons montré que la culture des CEA en présence de milieu conditionné de CSMh (mc-CSMh) permet de prévenir partiellement l'apoptose des CEA en hypoxie, en modulant la voie de signalisation HIF, et en prévenant l'accumulation et les effets délétères des ROS. L'effet protecteur des CSM impliquerait le KGF comme observé lors de la première étude, mais également le HGF.

Ces deux études indiquent que les CSMh sont susceptibles d'exercer des effets cytoprotecteurs paracrines vis-à-vis des CEA soumises à l'hypoxie aiguë ou prolongée, en limitant d'une part les modifications phénotypiques évocatrices de TEM, et d'autre part l'apoptose des CEA via la modulation des voies de signalisations hypoxiques. La sécrétion par les CSMh de KGF et de HGF, facteurs de croissance épithéliaux connus pour leurs effets bénéfiques sur les CEA, explique en partie les effets protecteurs paracrines des CSMh. Nos résultats suggèrent que les effets cytoprotecteurs des CSMh vis-à-vis des CEA pourraient contribuer aux effets bénéfiques des CSMh observés *in vivo* dans différents modèles animaux de fibrose induite, ou lors d'agressions alvéolaires aiguës.

Liste des abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonéal	CXCL8 : Chemokine (C-X-C motif) ligand-8
8-OHdG : 8-Oxo-2'-déoxyGuanosine	CXCR1 : Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 1
AQP : AQuaPorine	DARC : Duffy antigen/chemokine receptor
ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	DISC : Death Inducing Signaling Complex
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated	DMOG : Diméthylloxaloylglycine
BH : Bcl-2 Homology Domain	EGF : Epidermal Growth Factor
bHLH : Basic helix Loop Helix	ENaC : Epithelial sodium (Na ⁺) Channel
BMP : Bone Morphogenic Proteins	eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase
CAD : Caspases-Activated DNase	Fe : Fer
CAD : C-terminal Activation Domain	FIH : Factor Inhibiting HIF
CBP/p300 CREB-binding protein/E1A Binding Protein P300	FLIP : FADD-Like IL-1 β -converting enzyme Inhibitory Protein
CEA : Cellules Epithéliales Alvéolaires	FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator	GLUT1 : GLUcose Transporter
CNG : Cyclic Nucleotide-Gated ion channel	GPx : Glutathione Peroxydase
CO : Monoxide de Carbone	HDAC : Histone DésACétylase
COX : Cytochrome c OXidase	HGF : Hepatocyte growth factor
CSM : Cellules souches mésenchymateuses	HIF : Hypoxia inducible factor
Cu : Cuivre	HSC : Highly Selective cation Channel
Cx43 : Connexine 43	HSP : Heat Shock Protein
	hTR : human Telomerase RNA
	IAP : Inhibitors of APoptosis

ICAD : Inhibitor Of Caspases-Activated
Dnase

IDO : Indoléamine 2,3-Dioxygénase

Ig : Immunoglobuline

IL-1 : InterLeukine -1

INOS : Inducible Nitric Oxide Synthase

ISP : Ion Sulfur Group

KGF : Keratinocyte Growth Factor

KO : Knock-Out

LAP : Latency-Associated Peptide

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LTB4 : Leucotriène B4

LTBP : Latent TGF Binding Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein
Kinases

MCP-1 : Monocyte Chimoattractant
Protein 1

MDA : Malonaldéhyde

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MET : Transition Mésenthélio-Epithéliale

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory
Proteins-1 α

Mir : Micro-RNA

MMP : Matrix Metalloproteinases

Mptp : Pore De Transition De Perméabilité
Membranaire

MSC : Mésenchymal Stem Cells

MUC5B : Mucin 5B

NAC : N-Acétyl-Cystéine

NAD : N-Terminal Activation Domain

NADH : Nicotinamide Adénine
Dinucléotide

NF- Kb : Nuclear Factor-Kappa B

NK : Natural Killer

NO : Oxide Nitrique

NSC : Nonselective Cation Channel

ODDD : Oxygen-Dependant Degradation
Domain

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAS : PER-ARNT-SIM

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDK1 : Pyruvate Deshydrogénase Kinase

PGE2 : Prostaglandine E2

PHD : Prolyl Hydroxylase

PI : Pneumocytes De Type I

PIDC : Pneumopathies Interstitielles
Diffuses Chroniques

PII : Pneumocytes De Type II

PIKK : Phosphoinositide 3-Kinase Related
Protein Kinase

PPFIA1 : Protein tyrosine Phosphatase,
receptor type, F Polypeptide (PTPRF)-
Interacting liprin Alpha 1

Prx : Péroxyrédoxine

pVHL : Von Hippel-Lindau protein
ROS : Reactive Oxygen Species
SDRA : Syndrome de Détresse
Respiratoire Aiguë
SID : Smad Interacting Domain
SIM : SIngle-Minded protein
SMA : Smooth Muscle Actin
SOD : SuperOxide Dismutase
SP : Surfactant Protein
SQE : Ser-Gln-Glu
SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator-1
STX-100 : anti- α v β 6 mAb
SUMO1 : Small Ubiquitin-related
MOdifier 1
TEM : transition épithélio-
mésenchymateuse
TERC : TELomerase RNA Component
TERT : TELomerase Reverse Transcriptase
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
TIF-2 : Transcriptional
mediators/Intermediary Factor 2
TIMP : Tissue Inhibitor of
Metalloproteinases
TLR : Toll-Like Receptor
TM : TransMembrane domain
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
TOLLIP : TOLL Interacting Protein

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related
Apoptosis Inducing Ligand
Trx : Thiorédoxine
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl
transferase dUTP Nick End Labeling
VBC-CUL-2 E3 : VHL-elongin B-elongin
C CULin-2 E3 Ligase
VEGF : vascular endothelial growth factor
LPIV : Lésions Pulmonaires Induites par la
Ventilation (= VILI en anglais)
XO : Xanthine Oxidase
Zn : Zinc

Liste des figures

Fig 1. Schéma de l'arbre bronchique.

Fig 2. Schéma du poumon distal (A) et d'une alvéole (B).

Fig 3. Représentation schématique des transports ioniques dans les pneumocytes de type I (AT1) et II (AT2).

Fig 4. Formation de dômes en culture par les CEA.

Fig 5. Processus impliqués dans la réparation des alvéoles pulmonaires après lésion.

Fig 6. Coupe tomodensitométrique d'un patient.

Fig 7. Coupe histologique de poumon.

Fig 8. Schéma de la pathogénie de la fibrogénèse pulmonaire idiopathique.

Fig 9. Schéma représentant les différentes évolutions de la FPI au cours du temps.

Fig 10. Radiographies thoraciques.

Fig 11. Coupe histologique de biopsie pulmonaire.

Fig 12. Schéma de la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Fig13. Schéma présentant les différents effets bénéfiques des CSM dans l'alvéole pulmonaire dans un cas de SDRA.

Fig 14. Structure des facteurs de transcription HIF.

Fig 15. Régulation de HIF selon le taux d'oxygène intracellulaire.

Fig 16. Chaîne mitochondriale de transfert des électrons.

Fig 17. Effet de l'hypoxie sur la production de ROS.

Fig 18. Cycle d'oxydation du coenzyme Q par le complexe III de la chaîne respiratoire.

Fig 19. Génération des espèces réactives à l'oxygène, et principaux mécanismes de défense antioxydants.

Fig 20. Représentation de la structure des différentes IAP.

Fig 21. Schéma représentant le déclenchement de l'apoptose, par la voie intrinsèque ou extrinsèque.

Fig 22. Représentation de la structure des différents membres pro-apoptotiques mitochondriaux de la famille Bcl-2.

Fig 23. Représentation de la structure des différents membres anti-apoptotiques mitochondriaux de la famille Bcl-2.

Fig 24. Schéma représentant la transition épithélio-mésenchymateuse.

Fig 25. Schéma représentant les différents types de TEM.

Fig 26. *Schéma des principales voies conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions impliqués dans la TEM.*

Fig 27. Schéma représentant le rôle et la régulation des facteurs de transcription intervenant dans la TEM.

Fig 28. Schéma représentant la différenciation des cellules souches multipotentes issues de moëlle osseuse.

Fig 29. Effets immunomodulateurs des CSM.

Fig 30. Réduction de la fibrose dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine.

Fig 31. Effet immunomodulateur des microvésicules sécrétées par les CSM.

Fig 32. Formation de nanotubes entre des CSM et des cellules tubulaires rénales.

Fig 33. *Schéma du protocole de l'étude 1.*

Fig 34. *Evolution du nombre de CEA en fonction du temps, du taux d'oxygène en présence ou non de CSM.*

Fig 35. *Schéma du protocole de l'étude 2.*

Fig 36. Effet du milieu conditionné de CSM sur la viabilité des CEA en culture.

Fig 37. Effet du milieu conditionné réalisé en condition normoxique ou hypoxique sur *l'apoptose des CEA en hypoxie.*

Fig 38. *Effet du milieu conditionné sur l'expression de HIF-1 et de HIF-2 dans les A549.*

Introduction

1. Lésions et réparation de l'alvéole pulmonaire

1.1. L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un ensemble d'organes permettant la respiration, mettant en jeu des échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement. Ces échanges gazeux sont indispensables à la vie de nos cellules, permettant la respiration mitochondriale et régulant l'équilibre acido-basique de l'organisme via l'expiration du dioxyde de carbone (CO_2) produit par l'organisme. Le système respiratoire s'étend du nez jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Il est constitué de deux zones : la zone de conduction et la zone de diffusion. L'air atmosphérique pénètre par les voies aériennes supérieures (fosses nasales, pharynx, larynx), conduisant l'air extérieur humidifié, réchauffé et partiellement purifié des impuretés par le mucus tapissant les cavités nasales vers les bronches puis les poumons. Dans les parties les plus distales se trouvent les alvéoles pulmonaires, où les échanges d'oxygène (O_2) et de dioxyde de carbone (CO_2) vont se faire par simple diffusion avec le sang des capillaires pulmonaires.

1.1.1. Mécanique de la respiration

La ventilation consiste en la répétition automatique d'une inspiration au cours de laquelle l'air riche en O_2 pénètre dans les poumons suivie d'une expiration au cours de laquelle de l'air appauvri en O_2 et enrichi en CO_2 quitte les poumons.

Ce mécanisme repose sur une variation de pression dans la cage thoracique au cours des cycles inspiration/expiration, l'écoulement des gaz s'effectuant de la zone de forte pression vers la zone de plus basse pression. Lors de l'inspiration, la contraction du diaphragme et des muscles intercostaux permet l'expansion de la cage thoracique et étire les poumons. Ainsi, la pression qui règne à l'intérieur des poumons diminue. Dès lors que la pression intra-alvéolaire devient plus faible que la pression atmosphérique, l'air peut pénétrer dans l'organisme et s'écouler naturellement pour remplir les poumons jusqu'à ce que les pressions s'égalisent. Au cours de l'expiration, le relâchement des muscles et l'élasticité des poumons permettent à la cage thoracique de retrouver son volume initial. Le volume pulmonaire diminuant, la pression

intra-alvéolaire augmente et dépasse la pression atmosphérique, entraînant une sortie d'air des poumons.

1.1.2. Anatomie du poumon

L'être humain possède deux poumons asymétriques. Le poumon droit est composé de trois lobes (supérieur, moyen et inférieur), le gauche de deux lobes (supérieur et inférieur), afin d'accueillir dans sa face interne le cœur.

Les poumons sont divisibles en deux zones fonctionnelles : la zone de conduction et la zone respiratoire. La zone de conduction est constituée de la trachée, des bronches et des bronchioles, dont le rôle est de conduire l'air, mais aussi de l'humidifier et de le filtrer (l'épithélium cilié bronchiolaire sécrétant du mucus). Cette zone correspond à l'espace mort anatomique, c'est-à-dire au volume d'air qui ne participe pas aux échanges gazeux. La zone respiratoire ou zone d'échange regroupe les bronchioles respiratoires et les alvéoles, au niveau desquelles se déroulent les échanges gazeux avec les capillaires pulmonaires.

L'arbre bronchique [Figure 1] est constitué de 23 niveaux de ramifications, dont les 16 premiers constituent la zone de conduction. Les 7 générations suivantes représentent la zone transitionnelle et respiratoire où siègent des échanges gazeux. Ces multiples divisions permettent d'augmenter la surface de section, qui passe de 2,5 cm² dans la trachée à 11800 cm² dans les alvéoles.

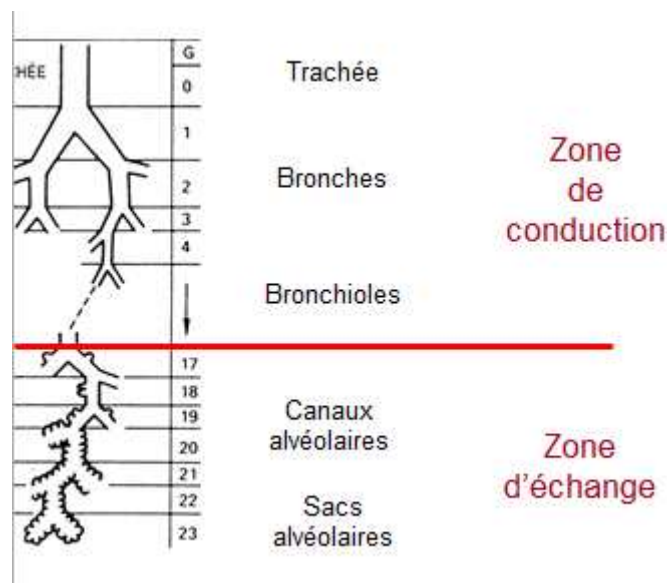


Fig 1. Schéma de l'arbre bronchique.

1.1.3. L'alvéole pulmonaire

Les poumons humains sont constitués d'environ 300 millions d'alvéoles. Celles-ci sont entourées de capillaires pulmonaires, en contact étroit avec l'épithélium alvéolaire pour former la barrière alvéolo-capillaire qui représente une surface totale d'échange d'environ 70-75 m². La finesse de la barrière alvéolo-capillaire (0,5 µm) est parfaitement adaptée à la fonction de transfert des gaz.

Les sacs alvéolaires sont composés de plusieurs types cellulaires [Figure 2] :

- des cellules épithéliales alvéolaires (CEA) formant l'épithélium alvéolaire qui recouvre la face luminale des alvéoles.
- des fibroblastes présents dans le tissu conjonctif jouant un rôle important dans la réparation de l'épithélium alvéolaire après lésion (ci-dessous). Par ailleurs, la matrice extracellulaire (MEC) sécrétée par ces cellules assure le maintien de l'architecture pulmonaire.
- des macrophages à forte activité phagocytaire et bactéricide (sécrétion de peroxydes) qui représentent 2% des cellules pulmonaires. Ils sécrètent également des facteurs de croissance (Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukine 1 (IL-1), Transforming Growth Factor (TGF-β)), des protéases (élastase, collagénase), des lipides inflammatoires (comme les Leucotriènes B4 (LTB4)).
- des cellules endothéliales bordant les capillaires, en contact étroit avec l'épithélium alvéolaire, et participant à la membrane alvéolo-capillaire.

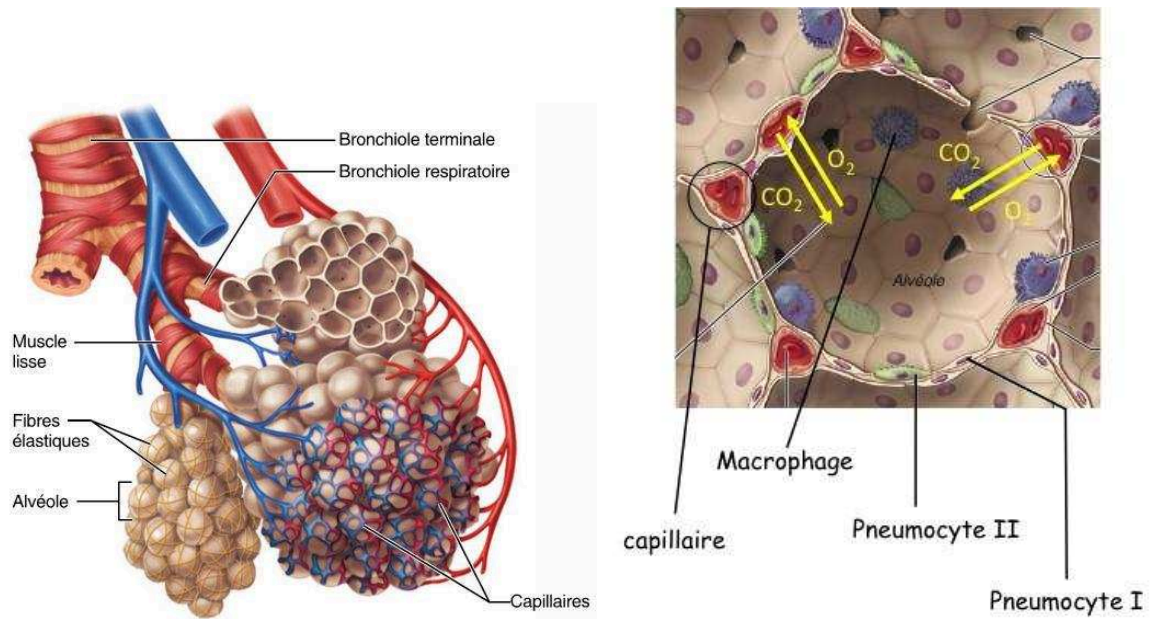


Fig 2. Schéma du poumon distal (A) et d'une alvéole (B). Les alvéoles et les capillaires sont en contacts étroits. L'endothélium capillaire et l'épithélium alvéolaire fusionnent au niveau de la membrane basale, afin de faciliter les échanges gazeux. (traduit de « Anatomy and physiology » Dr. Marieb).

L'épithélium alvéolaire est constitué de deux types de cellules épithéliales :

- Les pneumocytes de type I (PI), aplatis (50-100 nm), très étalés (50-100 μm) de par leurs extensions cytoplasmiques. Pauvres en organites, ces cellules rentrent dans la constitution de la membrane alvéolo-capillaire à travers laquelle diffusent les gaz, et participent à la clairance alvéolaire en assurant un transport d'ions et de fluides ([Dobbs 2007](#)). Bien que ne représentant qu'environ 8% de la population cellulaire totale du poumon et 1/3 des pneumocytes, ces PI recouvrent 95 à 99% de la surface alvéolaire ([Stone 1992](#)).

- Les pneumocytes de type II (PII), dont la morphologie est très différente de celles des PI. Il s'agit de cellules cuboïdales, avec une face apicale bordée de nombreuses villosités, et une face baso-latérale reposant sur la lame basale continue. Sur cette face, les prolongements cytoplasmiques des PII viennent s'accoler aux cellules fibroblastiques interstitielles. Contrairement aux PI, les PII possèdent de nombreux organites, un nombre important de mitochondries, un réticulum endoplasmique et un Golgi très développés. Ces PII, représentent environ 14% des cellules pulmonaires et les 2/3 des pneumocytes, et recouvrent 2 à 5% de la surface alvéolaire totale ([Stone 1992](#)).

Les pneumocytes II ont de multiples rôles :

- i) ils sécrètent le surfactant (voir plus loin)
- ii) ils sont impliqués (de même que les pneumocytes I) dans l'homéostasie liquidienne des alvéoles grâce au transport transcellulaire actif d'ions sodium du compartiment alvéolaire vers le compartiment interstitiel (voir plus loin)
- iii) ils sont les cellules progénitrices des PI
- iv) ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires
- v) La sécrétion de collectines et de défensines participent également à la défense immunitaire
- vi) ils participent à la formation de la matrice extracellulaire (MEC), en sécrétant de la fibronectine, du procollagène de type IV, de la laminine.

Les pneumocytes sont reliés entre eux au niveau de leurs membranes latérales par des complexes jonctionnels constitués de jonctions serrées, de jonctions adhérentes, de desmosomes et de jonctions communicantes. Les jonctions serrées (constituées des zonula occludens, des claudines et occludines en relation avec le réseau d'actine sous-jacent) jouent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium. En effet, elles assurent l'étanchéité de l'épithélium en empêchant le passage libre des ions et molécules à travers la membrane ([Herard 1996](#)). Les jonctions adhérentes forment une ceinture de contacts continue mais non étanche entre les cellules. La formation de ces jonctions repose sur l'interaction homophile de molécules d'E-cadhérine à la surface de deux cellules adjacentes. Du côté cytoplasmique l'E-cadhérine est connectée au cytosquelette d'actine. Les jonctions communicantes, formées par les connexines (Cx) dont Cx43, relient entre elles les cellules épithéliales ([Guo 2003](#)). De plus, ces jonctions assurent le passage de solutés et de molécules inférieures à 1 kDa entre les cellules et permettent de propager les oscillations calciques ([Evans 1999](#)), nécessaires à l'exocytose des corps lamellaires ([Ashino 2000](#)).

1.1.4. Fonctions de l'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire remplit diverses fonctions physiologiques clés.

1.1.4.1. L'hématose

L'hématose représente les échanges gazeux entre les alvéoles et le sang permettant au sang veineux de se décharger partiellement du CO₂ et de s'enrichir en O₂. Ces échanges gazeux se

produisent de manière passive à travers la membrane alvéolo-capillaire, très fine, formée par les pneumocytes reposant sur la lame basale largement fusionnée avec l'endothélium des capillaires pulmonaires. Le mouvement d'un gaz entre deux compartiments repose sur la pression partielle de ce gaz dans chacun des compartiments. Ainsi, un gaz diffuse du compartiment où il présente la plus forte pression partielle vers le compartiment où il a la plus faible pression partielle. Ainsi, au niveau de nos poumons, l'O₂ diffuse des alvéoles pulmonaires vers les capillaires pulmonaires, tandis que le CO₂ diffuse en sens inverse, en suivant leur gradient de pression partielle.

1.1.4.2. La sécrétion du surfactant

Le surfactant pulmonaire est un matériel tensioactif complexe élaboré par les PII, stocké dans les cellules sous forme de corps lamellaires ([Murray 1986](#)). Il est constitué d'environ 90 % de lipides (principalement des phospholipides) et de 10 % de protéines. Après exocytose au pôle apical des PII, les phospholipides, dont la forme majoritaire est la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), sont d'abord stockés sous forme de myéline tubulaire dans l'hypophase alvéolaire, fine couche de fluide recouvrant la surface apicale des pneumocytes. Les phospholipides vont ensuite s'adsorber à la surface de l'hypophase dans la fine couche lipidique de surfactant à l'interface avec l'air. Cette épiphase de phospholipides amphiphiles permet d'abaisser la tension de surface. En effet, les septa inter-alvéolaires sont des structures non rigides qui tendent à s'affaisser sur elles-mêmes (collapsus) du fait des forces de tension superficielle. Grâce au surfactant, les alvéoles restent ouvertes durant l'expiration ce qui permet aux échanges gazeux de s'effectuer correctement. De par ses propriétés tensioactives, le surfactant limite également le travail ventilatoire et réduit le risque d'œdème pulmonaire.

Le surfactant est également constitué de quatre glycoprotéines caractéristiques (SP-A, B, C, D), jouant un rôle dans la formation du film de phospholipides (SP-B et SP-C), mais aussi dans l'opsonisation et l'élimination des pathogènes (SP-A et SP-D), et dans la régulation du mécanisme de recapture du surfactant par les PII ([Wright 1987](#)).

Le surfactant exerce des effets anti-inflammatoires en réduisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, la production d'oxyde nitrique par les neutrophiles, monocytes et macrophages alvéolaires, et des effets anti-oxydants, par ses activités catalase et SOD ([Bersani 2013](#), [Matalon 1990](#)). Le surfactant limite la prolifération des fibroblastes ainsi que leur sécrétion de facteurs impliqués dans le remodelage pulmonaire ([Whitsett 2015](#)).

1.1.4.3. Les transports ioniques et protéiques

L'hypophase alvéolaire est une fine couche hydroélectrolytique contenant des ions sodium (Na^+) et chlorures (Cl^-) à des concentrations proches de celles des liquides interstitiels qui recouvrent la surface apicale des pneumocytes. Le volume de l'hypophase alvéolaire (d'une épaisseur d'environ 200 nm) doit rester très faible afin de ne pas compromettre les échanges gazeux. La régulation de ce volume est assurée par les pneumocytes grâce à une réabsorption active d'ions couplée à un mouvement d'eau, définissant ainsi la clairance du fluide alvéolaire. En effet, les pneumocytes transportent activement par voie transcellulaire des ions Na^+ de l'hypophase vers le compartiment interstitiel basolatéral. Ces mouvements de cations génèrent une différence de potentiel transépithéliale à l'origine d'une réabsorption passive d'anions Cl^- dans le même sens, essentiellement par voie paracellulaire. Le gradient osmotique ainsi créé de part et d'autre de l'épithélium alvéolaire induit une réabsorption d'eau de l'alvéole vers l'interstitium.

Les pneumocytes (PI et PII) possèdent des canaux ENaC (Epithelial Na^+ Channel) hautement sélectifs pour les cations (HSC) ou non sélectifs (NSC) inhibés par l'amiloride qui permettent l'entrée apicale du Na^+ selon un gradient électrochimique favorable. Des canaux CNG (Cyclic Nucleotide-Gated channels), inhibés par le pimozide, présents essentiellement dans les PI, permettent également l'entrée apicale des ions Na^+ ([Mason 1982](#), [Matalon 1999](#), [Kemp 2001](#), pour revue [Johnson 2006](#)) [Figure 3]. Les ions Na^+ sont ensuite extrudés activement au pôle basolatéral des pneumocytes vers l'interstitium pulmonaire par la pompe Na^+/K^+ ATPase (inhibée par la ouabaine). La clairance des ions Na^+ est majoritairement effectuée par les PI (pour revue [Johnson 2006](#)).

Bien que la réabsorption d'anions Cl^- se fasse essentiellement par voie paracellulaire en situation basale, les pneumocytes de type I et II possèdent également à leur membrane apicale des canaux CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), permettant potentiellement l'entrée dans la cellule d'ions chlorures Cl^- ([Fang 2006](#), pour revue [Johnson 2006](#)). Il semble que les canaux CFTR soient activés en situation d'œdème pulmonaire sous l'influence des catécholamines endogènes ([Fang 2006](#)).

Ces flux d'ions entraînent la réabsorption d'eau par voie paracellulaire vers l'interstitium, entraînant également des ions (Na^+ , Cl^- , K^+). D'autre part, les pneumocytes expriment à leur surface des canaux aquaporines (AQP), sélectifs pour l'eau. Les canaux AQP4 et AQP5 sont présents à la surface apicale des pneumocytes de type I, tandis que l'AQP3 est exprimé par les

pneumocytes de type II au niveau basolatéral. Ces canaux participent aux mouvements d'eau trans-épithéliaux (Nielsen 1997, Kreda 2001) [Figure 3].

Ces canaux jouent un rôle dans l'homéostasie liquidienne des alvéoles, mais également dans le maintien de la fonction des PII, impliqués dans le processus de réparation de l'épithélium respiratoire (Trinh 2007).

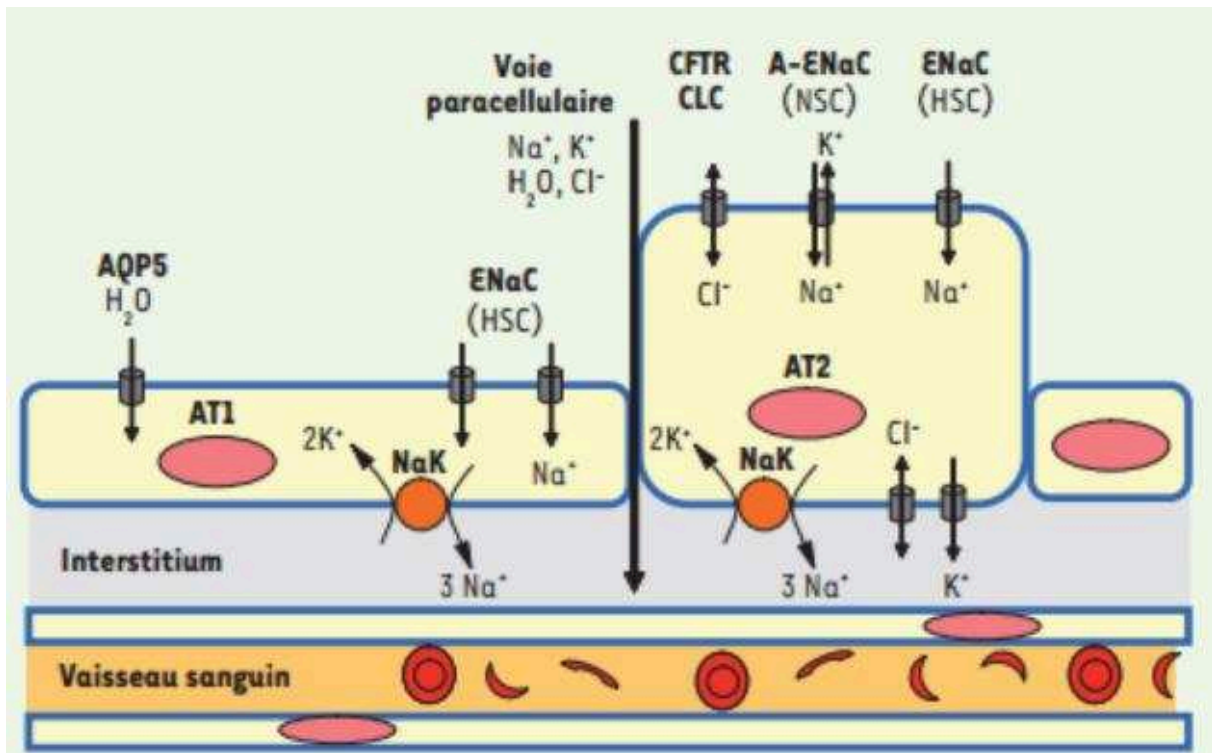


Fig 3. Représentation schématique des transports ioniques dans les pneumocytes de type I (AT1) et II (AT2). AQP5 : aquaporine 5 ; CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; CNG : canal sodique épithélial ; ENaC : canal sodique épithélial : (NSC : non sélectif ; HSC : hautement sélectif) ; Na,K-ATPase : sodium-potassium adénosine triphosphatase. (Dagenais 2009)

Le passage d'ions du pôle apical au pôle basolatéral, crée une différence de potentiel trans-épithélial. In vitro, on peut mesurer la résistance du tapis cellulaire au passage du courant lorsque les pneumocytes sont cultivés sur support semi-perméable (filtre Transwell®). La résistance électrique transépithéliale (Rte) renseigne sur le caractère « serré » des jonctions intercellulaires et sur les activités de transports ioniques. Lorsque les pneumocytes sont

cultivés sur fond de plastique, on peut observer des dômes ou cystes, témoins du transport d'électrolytes et de fluide du pôle apical vers le pôle baso-latéral. [Figure 4].

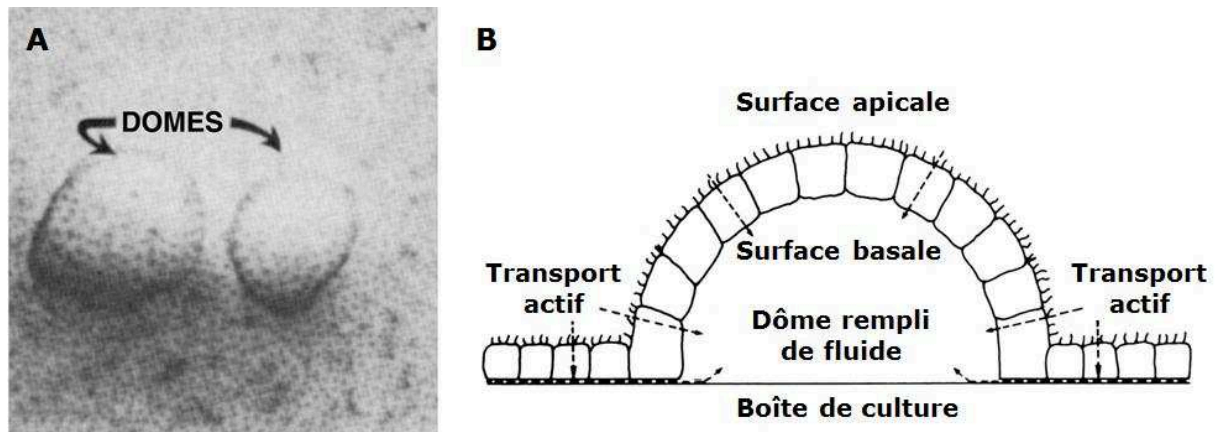


Fig 4. Formation de dômes en culture par les CEA. A. Photo en microscopie optique montrant la formation de dômes par des cellules épithéliales de type II après 3 jours de culture B. Schéma d'un dôme résultant de l'accumulation de fluide entre les cellules épithéliales de type II en culture sur fond de plastique (objectif x40, dômes d'environ $1\mu\text{m}$ de diamètre). (Adapté de [Mason 1982](#), [Matthay 2002](#))

Une clairance alvéolaire des protéines existe également. La translocation par la barrière alvéolo-capillaire peut se faire par transcytose (pour l'albumine, les IgG et IgA), par endocytose ou encore par pinocytose, bien que pour ce dernier cas, les protéines semblent être dégradées. ([Kim 2003](#)). Certaines protéines peuvent franchir la barrière alvéolo-capillaire, dans les 2 sens, à une vitesse dépendante de leur poids moléculaire si aucun récepteur spécifique n'est présent ([Folkesson 1996](#), [Hastings 1992](#)).

1.2. La réparation physiologique de l'épithélium alvéolaire

1.2.1. Origines des lésions épithéliales

Le poumon fait l'objet d'agressions diverses et variées. Les alvéoles peuvent être lésées suite à l'arrivée dans les parties distales pulmonaires d'agents pathogènes (bactéries, champignons, virus). Des agents toxiques comme la fumée de cigarette, des gaz polluants (chlore, dioxyde de soufre), certains types de médicaments dirigés contre des maladies

cardiovasculaires (amiodarone, statines), des anticancéreux (bléomycine...) et autres antibiotiques (minocycline, nitrofurantine...) ([Ginsberg 1982](#), [Oh 2015](#), pour revue [Bonniaud 2014](#)), l'inhalation de microparticules comme l'amiante, le charbon, le silicium ([Heppleston 1984](#), [Merchant 1990](#)), des reflux gastro-œsophagiens sont autant de facteurs qui peuvent provoquer des lésions au niveau alvéolaire. Des maladies auto-immunes sont également en cause, telles que la sclérodermie, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus ([Titeca 2014](#), [Nielepkowicz-Goździńska 2015](#)). La ventilation mécanique utilisée en service de réanimation peut également provoquer ou aggraver des lésions déjà existantes.

1.2.2. Conséquences des lésions épithéliales

Selon le degré de sévérité des lésions au niveau alvéolaire, l'épithélium va être endommagé, la première conséquence majeure étant la dénudation, partielle ou totale, de la membrane basale (pour revue [Coraux 2004](#)). En effet, les pneumocytes de type I, très étalés et très fins, sont sensibles aux agressions et sont détruits rapidement ([Deneke 1980](#), [Murray 1986](#)). L'altération de la barrière alvéolo-capillaire compromet ainsi les fonctions de l'épithélium respiratoire, notamment la synthèse du surfactant et la clairance du fluide alvéolaire. De graves dommages peuvent mener à l'accumulation de liquide dans les alvéoles, causant ainsi un œdème ([Zabner 1985](#), [Ware 2001](#)) (ci-dessous).

Par ailleurs, la perte de l'intégrité épithéliale constitue une porte d'entrée pour les pathogènes (pour revue [Coraux 2004](#)). Bien que les macrophages exercent un rôle majeur en tant que première ligne de défense, une infection peut alors survenir, et entraîner une inflammation aiguë au niveau des alvéoles.

Il est donc important qu'en cas de lésion, l'épithélium alvéolaire puisse être régénéré de manière rapide et efficace, afin de restaurer un épithélium alvéolaire fonctionnel et de rétablir de manière optimale les échanges gazeux.

1.2.3. Processus de réparation épithéliale et facteurs mis en jeu

La réparation de l'épithélium alvéolaire après lésion s'effectue en plusieurs étapes : une phase inflammatoire et migratoire, une phase de prolifération des PII, et une phase de différenciation des PII en PI [Figure 5].

1.2.3.1. La phase inflammatoire et migratoire

Les analyses histologiques de poumons lésés montrent une accumulation précoce de neutrophiles. En effet, la membrane basale endommagée facilite l'entrée du liquide plasmatique dans l'alvéole. Cet exsudat est composé de protéines plasmatiques, de plaquettes et de cellules inflammatoires, sécrétant des facteurs pro-inflammatoires. D'autres cellules comme les PII ou les fibroblastes participent localement à la production de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les PII participent au recrutement de cellules inflammatoires, via la sécrétion d'IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, de leucotriènes ([Crestani 1994](#)).

La membrane basale dénudée se recouvre d'une matrice extracellulaire provisoire composée de fibrinogène, de fibronectine, de laminine, de collagène ainsi que de protéines plasmatiques ([McGowan 1992](#)), synthétisée par les fibroblastes sous-jacents, les cellules endothéliales ainsi que par les pneumocytes de type II ([Dunsmore 1996](#)).

Afin que les pneumocytes de type II migrent aux endroits où la lame basale est dénudée, ces cellules épithéliales vont sécréter des métalloprotéases (MMP), enzymes dégradant la matrice extracellulaire, dont les MMP1, 8 et 13 faisant partie de la classe des collagénases (appelées également gélatinases) ([Planus 1999](#)). La dégradation des fibres de collagène diminuerait l'adhésion cellulaire et la rigidité membranaire, facilitant ainsi la migration des pneumocytes de type II sur les fibres de fibronectine et de fibrinogène ([Kim 1996](#), [Kim 1997](#)). La composition de la matrice extracellulaire est finement régulée, du fait de la sécrétion d'inhibiteur des MMP, comme TIMP-2, dans le même temps par les PII ([D'Ortho 1997](#)).

D'autres facteurs chimiotactiques libérés par les pneumocytes permettent le recrutement de fibroblastes. Ces cellules vont sécréter des médiateurs solubles parmi lesquels le TGF- β , l'IL-13 ou le PDGF, qui vont induire une modification phénotypique des fibroblastes locaux en myofibroblastes, de manière transitoire. Les myofibroblastes contribuent à la réparation épithéliale, via la contraction du tissu lésé par la synthèse de composants matriciels (collagène, fibronectine), permettant de reformer la charpente nécessaire à la réparation épithéliale ([Hinz 2007](#)).

1.2.3.2. Phase de prolifération

La réparation de l'épithélium alvéolaire lésé requiert également une phase de prolifération des PII, considérés comme les progéniteurs des PI.

Lorsque l'épithélium est intègre, jointif, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales alvéolaires inhibent la prolifération des PII (pour revue [Gumbiner 2014](#), pour revue [McClatchey 2012](#)). Cependant, à la suite de la perte de PI (par nécrose ou apoptose), l'inhibition de contact est perdue et les PII peuvent alors proliférer.

Cette prolifération est sous la dépendance de facteurs de croissance mitogéniques, en particulier le Keratinocyte growth factor (KGF ou FGF-7) et l'Hepatocyte growth factor (HGF) sécrétés par les fibroblastes. Ces facteurs de croissance épithéliaux se lient à l'héparine et aux glycosaminoglycanes de la MEC, et vont stimuler la prolifération, la migration et l'adhérence des PII ([Panos 1993](#), [Ulich 1994](#), [Desai 2007](#), [Galiacy 2003](#), [Koval 2010](#)).

La prolifération des fibroblastes est, quant à elle, régulée en condition physiologique par les PII. En condition physiologique, les fibroblastes sous-jacents ne sécrètent que de faibles quantités de prostaglandine E2 (PGE2), un lipide dérivant de phospholipides membranaires. Sous l'effet de l'IL-1 α sécrété par les PII, la production de PGE2 par les fibroblastes est augmentée ([Pan 2001a](#), [Portnoy 2006](#)). De façon intéressante, les PII hyperplasiques produisent de grandes quantités de PGE2.

La PGE2 inhibe la prolifération des fibroblastes ([Fine 1987](#), [Pan 2001a](#), [Lama 2002](#)), ralentit leur vitesse de migration ([Kohyama 2001](#)), et réduit leur production de collagène ([Fine 1989](#)). De plus, la PGE2, induite par le TGF- β , inhibe la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ([McAnulty 1995](#), [Epa 2015](#)).

Ainsi, un dialogue entre les PII et les fibroblastes sous-jacents est nécessaire afin de réguler la prolifération de ces deux populations cellulaires.

1.2.3.3. Phase de de différenciation et restauration de l'intégrité de l'épithélium

A l'étape de prolifération succède une phase de différenciation des PII en PI. Les cellules cuboïdales perdent leurs inclusions lamellaires, s'aplatissent pour s'allonger sur la membrane basale, et acquièrent le phénotype caractéristique des PI.

La MEC joue un rôle important dans la différenciation des PII. Les contacts avec les cellules et les fibres environnantes modifient la morphologie, le métabolisme lipidique, et l'activité sécrétrice des PII (pour revue [Rannels 1989](#)).

Durant la phase de différenciation, contrairement à la phase proliférative, le TGF- β est sécrété par les PII et contribue à leur trans-différenciation en PI in vitro ([Bhaskaran 2007](#)). Par ailleurs, il est important de noter que le TGF- β est également un inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les cellules épithéliales ([Kasai 2005](#)) et une mauvaise régulation de sa sécrétion pourrait ainsi s'avérer problématique (ci-dessous).

Le TGF- β s'oppose à l'effet du KGF, qui préserve le phénotype des PII et induit in vitro la transdifférenciation des PI en PII ([Borok 1998](#), [Shannon 2001](#), [Qiao 2008](#)).

D'autres facteurs de croissances et des interleukines jouent d'autres rôles dans la réparation de l'épithélium, par leur activité mitogénique, leur rôle activateur ou modulateur dans l'adhérence et la migration des cellules (pour revue [Crosby 2010](#), [Stern 2003](#)).

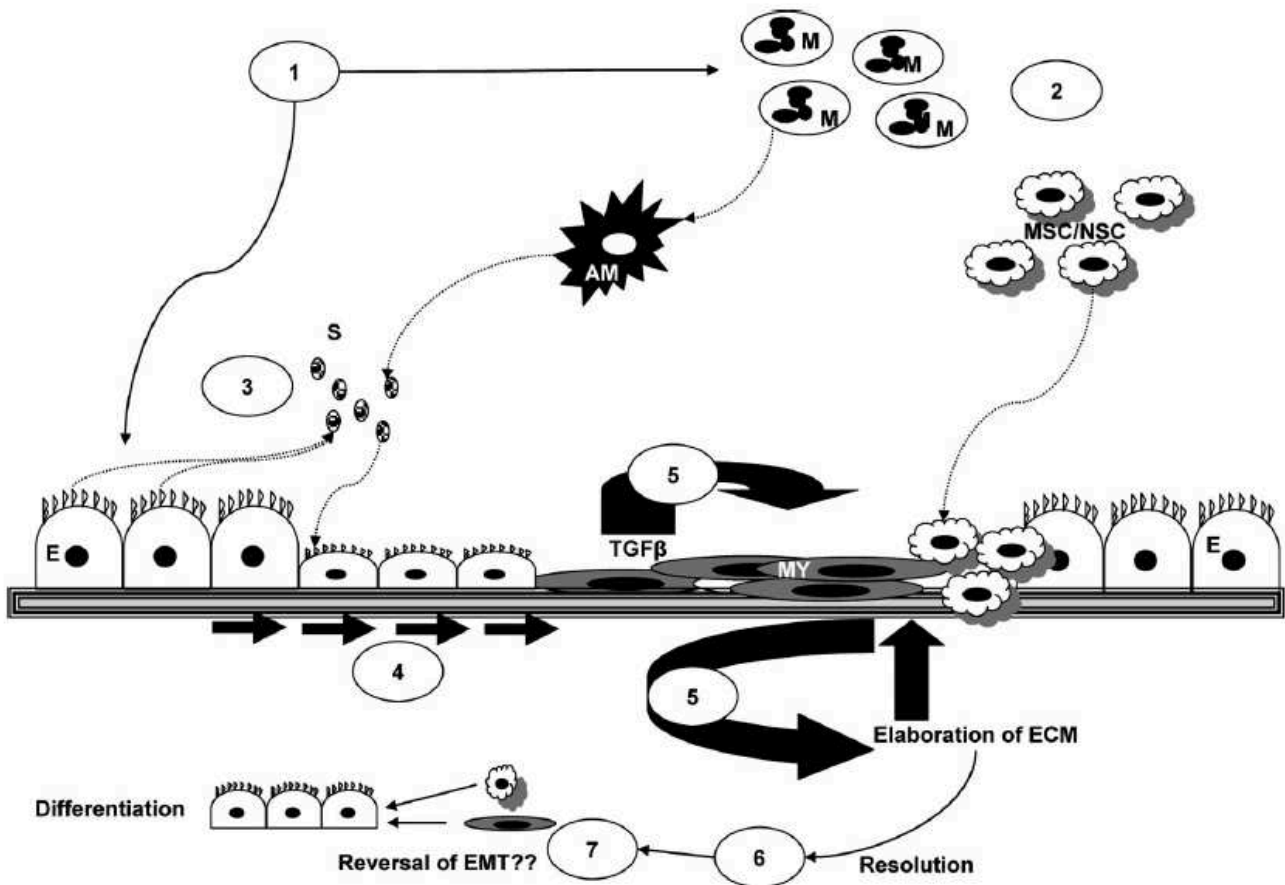


Fig 5. Processus impliqués dans la réparation des alvéoles pulmonaires après lésion. (1) Suite à une lésion, les macrophages sont activés. (2) des cellules souches mésenchymateuses sont recrutées au site lésionnel. (3) Des facteurs solubles sécrétés par les cellules *immunitaires et non immunitaires* induisent l'étalement et la migration des PII et des fibroblastes, pour (4) refermer la lésion. (5) Le TGF- β induit l'EMT des cellules épithéliales en myofibroblastes, permettant la formation d'une MEC provisoire. (6) prolifération des PII, disparition des macrophages activés. (7) différenciation des PII en PI ([Crosby 2010](#)).

Une dérégulation du dialogue entre les différents types cellulaires intervenants dans la réparation de l'épithélium alvéolaire peut se produire, notamment à la suite de lésions alvéolaires chroniques, et entrainer ainsi des situations pathologiques telles que la fibrose pulmonaire.

1.3. Exemples d'évolutions pathologiques des lésions de l'épithélium alvéolaire

1.3.1. La fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose pulmonaire est un terme générique qui désigne les pathologies interstitielles fibrosantes responsables d'une insuffisance respiratoire restrictive chronique. Les pneumopathies interstitielles diffuses chroniques (PIDC) regroupent plus de 200 affections. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) constitue, avec la sarcoïdose, la plus fréquente et la plus grave des PIDC, ces 2 pathologies regroupant plus de 50% des cas ([Valeyre 2010](#)).

1.3.1.1. Diagnostic et épidémiologie

La FPI est une maladie chronique progressive sans étiologie identifiée, caractérisée par une dyspnée d'installation progressive associée à une toux sèche. Des indices relevés par des examens d'explorations fonctionnelles permettent le suivi de la maladie (pour revue [Raghu 2011](#)).

L'examen de tomographie assistée par ordinateur permet d'établir le diagnostic de FPI, avec des lésions parenchymateuses basales bilatérales à type de réticulations sous-pleurales associées à des dilatations et déformations des bronches dans les zones de fibrose (bronchectasies de traction), et à des opacités en « rayon de miel » [Figure 6].

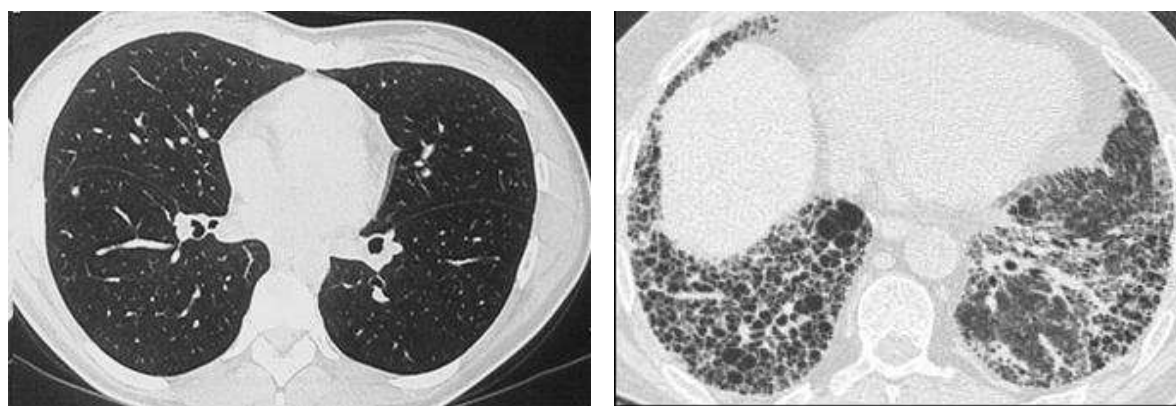


Fig 6. Coupe tomodensitométrique d'un patient (image de gauche : sujet sain ; image de droite : patient atteint de FPI) (Tirés de cours de C. Clerici – Paris 7).

Les patients âgés de moins de 50 ans sont rares. L'incidence de la maladie augmente avec l'âge, les symptômes arrivant typiquement entre 60 et 80 ans ([Gribbin 2006](#)), avec un âge moyen de 66 ans (pour revue [Ley 2011](#)). Les chiffres sur l'incidence varient selon les études et les critères diagnostiques. Une étude conduite en Amérique donne des chiffres d'incidence de l'ordre de 8.8-17.4 / 100 000 habitants par an, pour une prévalence de 27.9-63 / 100 000 personnes ([Fernandez-Pérez 2010](#)). La médiane de survie est estimée entre 2.5 et 3.5 ans à partir du moment du diagnostic ((pour revue [Ley 2011](#)), la plupart des patients décédant d'une défaillance du système respiratoire.

1.3.1.2. Histologie et physiopathologie

La figure 7 montre des coupes histologiques de poumons d'une personne saine et d'un patient atteint de FPI, où l'on note le remodelage de l'architecture du parenchyme pulmonaire, une densification des zones alvéolaires avec une accumulation de collagène produit par les fibroblastes. La fibrose se développe dans les régions distales des poumons, en particulier sous-pleurales. Chez des patients atteints de FPI, on retrouve une alternance de zones pulmonaires saines avec des zones de fibrose.

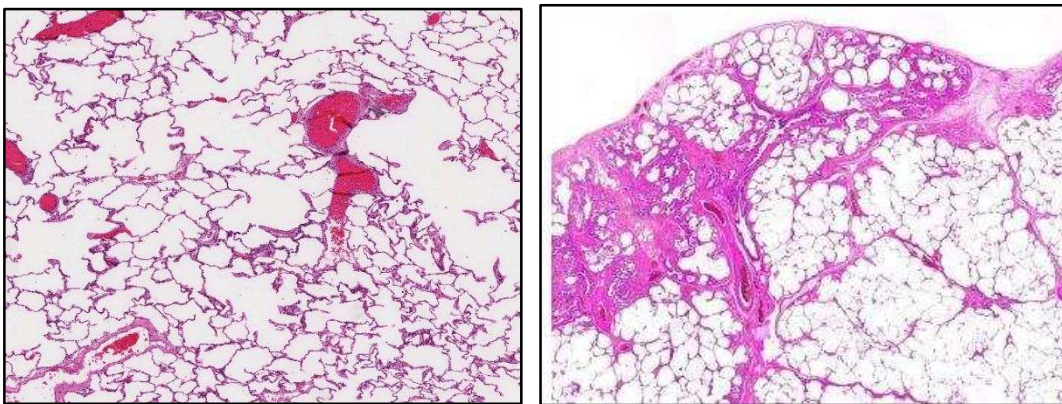


Fig 7. Coupe histologique de poumon. Sujet contrôle (à gauche) et patient atteint de FPI (à droite). Marquage éosine/hématoxiline (aimablement fournie par le Dr Marianne Kambouchner, Service d'Anatomopathologie, Hôpital Avicenne, Bobigny)

La pathogénie de la FPI reste mal connue à ce jour. Une première hypothèse reposait sur une inflammation chronique du poumon précédant la fibrose, comme dans d'autres pneumopathies interstitielles diffuses. Cependant, plusieurs observations nuancent l'importance de l'inflammation dans le déclenchement de la maladie. Une légère

inflammation est présente chez les patients atteints de FPI, mais de manière constante tout au long de l'évolution de la maladie. Certains modèles animaux développent des fibroses, sans qu'une réponse inflammatoire soit présente. Par ailleurs, la FPI ne répond pas aux traitements anti-inflammatoires (pour revue [Selman 2002](#)).

L'hypothèse actuelle repose sur une réparation anormale de l'épithélium, en réponse à de multiples micro-agressions répétées au niveau alvéolaire.

1.3.1.2.1. *Le défaut de réparation de l'épithélium respiratoire*

Au cours de la FPI, l'intégrité de l'épithélium alvéolaire est compromise [Figure 8]. Les alvéoles subissent une perte importante de pneumocytes de type I.

De plus, la capacité de transdifférenciation des PII en PI est altérée, du fait d'un environnement non propice à une réparation efficace (composition altérée de la matrice extracellulaire, défaut en facteurs de croissance) (pour revue [Kuhn 1991](#)).

La perte de PI contribuerait au développement de la fibrose, dans le sens où ces cellules sécrètent un facteur anti-fibrosant, la calvéoline 1 ([Wang 2006](#)). De plus, les PI présentent à leur surface le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) impliqué dans leur adhésion à la membrane basale. La perte de ce récepteur observée chez les patients atteints de FPI suggère son implication dans le défaut de réparation de l'épithélium alvéolaire, et dans le développement de la fibrose ([Englert 2008](#)).

Une perte de cellules épithéliales, par apoptose ou nécrose, est observée au niveau des foci fibroblastiques ([Uhal 1998](#)). A ces endroits, de nombreux fibroblastes, fibroblastes-like et myofibroblastes s'accumulent. Le profil de sécrétion des fibroblastes est altéré. Ces cellules présentent un défaut de sécrétion de KGF, d'HGF et de PGE2, respectivement nécessaires à la prolifération des PII, et à leur propre régulation ([Marchand-Adam 2003](#), [Marchand-Adam 2005](#)).

Le profil de sécrétion des PII hyperplasiques est également modifié. Ces cellules épithéliales vont sécréter des facteurs pro-fibrosants, comme le TGF- β , le TNF- α ([Kapanci 1995](#)), le PDGF ([Antoniades 1990](#)), le CTGF, facteur induit en réponse au TGF- β ([Xu 2003](#), [Pan 2001b](#)). La sécrétion par les PII de facteurs pro-coagulants comme le PAI-1 et PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitor), molécules anti-fibrinolytiques, facilite l'accumulation de fibrine dans les alvéoles (pour revue [Selman 2002](#)).

La mort massive des cellules épithéliales alvéolaires, la perte de l'intégrité épithéliale et un retard dans la réparation provoquent la migration, la prolifération, l'activation et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, induisant une accumulation de ces cellules au niveau alvéolaire ([Adamson 1990](#), pour revue [Scotton 2007](#)). L'origine des fibroblastes et myofibroblastes dans la FPI repose sur trois hypothèses : l'hypothèse classique propose que les fibroblastes résidant dans le poumon prolifèrent et se transforment en myofibroblastes sous l'effet de divers facteurs profibrosants. Une autre hypothèse suggère que les myofibroblastes résulteraient du recrutement et de la transformation de fibrocytes circulants issus de la moelle osseuse, attirés vers les zones lésées en réponse à des chimiokines ([Andersson-Sjoland 2008](#), pour revue [Bonniaud 2005a](#)). Les CEA pourraient intervenir dans ce recrutement de fibrocytes. En effet, les CEA de patients de FPI expriment fortement la chimiokine CXCL-12 (aussi appelé Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1), conduisant au recrutement des fibrocytes ([Phillips 2004](#), [Andersson-Sjöland 2008](#)). Une hypothèse plus récente est que les cellules épithéliales des voies aériennes, dont les pneumocytes, pourraient subir une TEM, et acquérir un phénotype myofibroblastique ([Willis 2005](#)).

L'accumulation dérégulée de fibroblastes et de myofibroblastes, ainsi que la perte excessive des PII, conduisent à la fibrose progressive du poumon, altérant de manière irréversible l'efficacité des échanges gazeux.

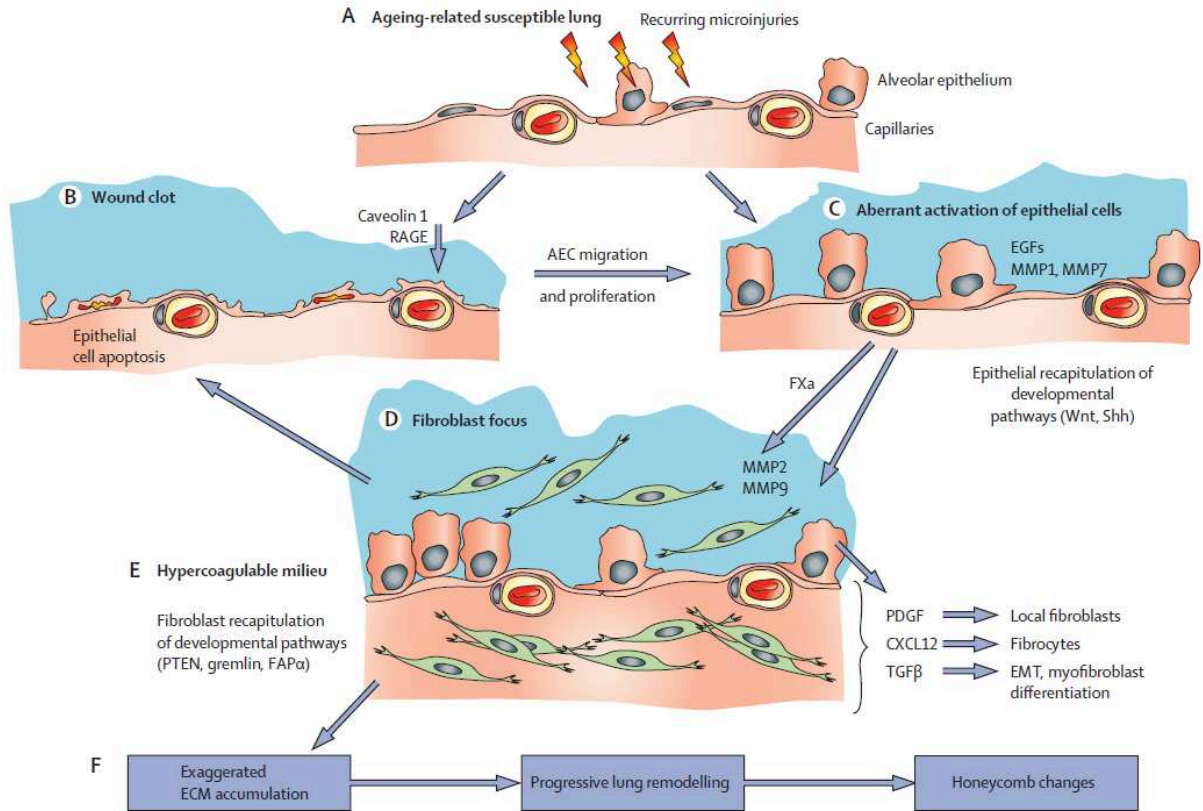


Fig 8. Schéma de la pathogénie de la fibrogénèse pulmonaire idiopathique.
 Abréviations: MEC matrice extra-cellulaire, PDGF platelet derived growth factor, TGF transforming growth factor, CXCL12 chemokine récepteur (CXC motif)-12, Shh Sonic hedghog, TEM transition épithélio-mésenchymateuse. CEA cellule épithéliale alvéolaire, RAGE receptor of advanced glycation end product ([King 2011](#)).

1.3.1.2.2. Une inflammation délétère

Bien que le défaut de réparation de l'épithélium alvéolaire soit admis comme étant le facteur déclenchant dans l'apparition de la FPI, une inflammation est présente lors des phases d'exacerbation aiguës qui peuvent émailler l'évolution de la maladie. En effet, lors de ces périodes de détérioration rapide de la fonction respiratoire, on retrouve chez les patients des taux plus élevés de neutrophiles et de cytokines pro-inflammatoires dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), par rapport aux LBA recueillis avant la phase d'exacerbation aiguë ([Schupp 2015](#)).

Les neutrophiles et macrophages recrutés aux sites lésionnels sont des sources de facteurs pro-TEM tels que le TGF- β , IL-1 β , et le TNF- α ([Fichtner-Feigl 2006](#), [Kolb 2001](#), [Bates](#)

2003), connus pour induire la sécrétion de collagène par les fibroblastes (pour revue [Chapman 2011](#)).

1.3.1.2.3. Evolution de la maladie

L'évolution de la FPI au cours du temps est différente d'un patient à un autre [Figure 9]. La pathologie peut évoluer de manière très rapide, avec des symptômes visibles quelques mois seulement après le déclenchement de la maladie, et une dégradation rapide de l'état de santé du patient [Figure 9. A]. Les gros fumeurs sont le plus souvent retrouvés dans cette catégorie (pour revue [Ley 2011](#)). Des actes médicaux peuvent constituer des facteurs d'exacerbations aiguës, tels que des opérations chirurgicales thoraciques, des lavages broncho-alvéolaires, la ventilation mécanique (pour revue [Ryerson 2015](#)).

Chez d'autres patients le déclin est lent et continu, avec une diminution progressive de la fonction pulmonaire [Figure 9. C et D]. Une étude réalisée sur 47 patients pendant 9 ans montre que 19% de ces patients présentaient ce type d'évolution ([Fernandez Pérez 2010](#)).

L'évolution de la maladie peut enfin se faire par l'alternance de phases de relative stabilité, avec des épisodes d'exacerbations aiguës, caractérisés par une détérioration rapide de la fonction respiratoire en quelques jours ou semaines [Figure 9. B].

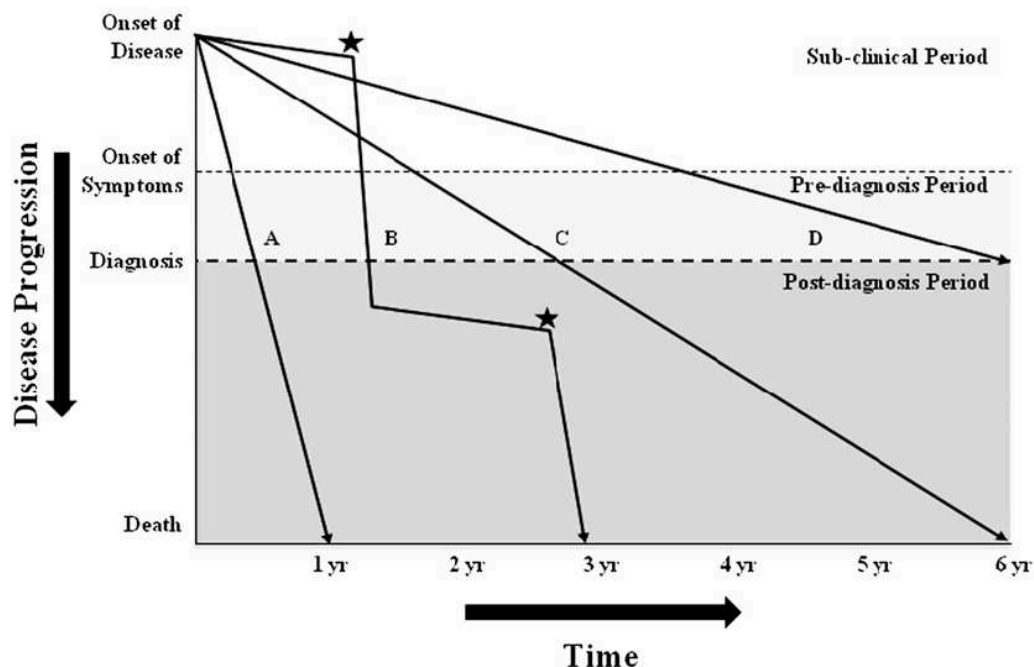


Fig 9. Schéma représentant les différentes évolutions de la FPI au cours du temps. (A) déclin rapide et continu. (B) déclin mixte, entre périodes de stabilité, et périodes de déclin rapide (représenté par une étoile). (C, D) déclin progressif mais lent. ([Ley 2011](#)).

1.3.1.3. Facteurs de risque

Bien que l'origine précise de la FPI reste indéterminée par définition, certains facteurs pourraient, à la suite de micro-traumatismes répétés, déclencher un processus fibrosant. Il s'agit notamment du tabac, des infections, de l'exposition à des poussières issues de métaux ou de bois, le reflux gastro-œsophagien avec l'arrivée d'acide dans les bronches (pour revue [Raghu 2011](#)).

Des formes familiales de FPI sont décrites en proportion variable, de 0.5% à 20% des cas ([Marshall 2000](#), [Garcia-Sancho 2011](#)). L'antécédent familial de fibrose pulmonaire constitue un facteur de risque majeur, plus important que le tabagisme et autres facteurs environnementaux ([Garcia-Sancho 2011](#)).

Parmi les formes familiales connues, les personnes présentant des mutations des protéines du surfactant SP-C et A2 (gène SFTPA2) ont un risque accru de développer une FPI. Le mauvais repliement de ces protéines dans le réticulum endoplasmique provoquerait une cytotoxicité dans les PII, empêchant ainsi la ré-épithélialisation alvéolaire après lésion ([Nogee 2001](#), [Wang 2009](#)).

Une susceptibilité à développer une FPI est également associée à un raccourcissement anormal des télomères. Plusieurs gènes impliqués dans le maintien de la longueur des télomères se retrouvent mutés chez des patients atteints de FPI (gènes TERT, hTR ou TERC) ([Armanios 2007](#), [Tsakiri 2007](#)). Ces mutations sont observées dans 15 à 20% des formes familiales de FPI.

Les gènes TOLLIP, TLR3 et MUC5B sont impliqués dans les réponses immunitaires associés au stress oxydatif. TOLLIP encode une protéine inhibitrice agissant en aval des Toll-Like Receptors (TLR), médiateurs de la réponse immunitaire et inhibant l'action du TGF- β ([Noth 2013](#), [O'Dwyer 2013](#)). MUC5B code une mucine, protéine composant le mucus. Le mucus joue un rôle de lubrification, d'humidification de l'air, et constitue une barrière anti-infectieuse dans le poumon en participant à la clairance muco-ciliaire ([Fahy 2010](#)).

Le polymorphisme de MUC5B est associé à la FPI ([Seibold 2011](#)). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette relation. Le variant induit une augmentation de l'expression de MUC5B, qui pourrait diminuer l'efficacité des défenses du poumon vis-à-vis de pathogènes, induisant ainsi une augmentation des micro-lésions au niveau alvéolaire. Le polymorphisme de MUC5B pourrait perturber la réparation alvéolaire, en perturbant l'interaction des PII avec

la MEC et le surfactant. Le polymorphisme de TOLLIP modifie la réponse des patients FPI au traitement par l'antioxydant N-acétyl-cystéine (NAC) (*ci-dessous*) ([Oldham 2015](#)). Selon leur profil génétique, la NAC s'est avérée avoir un effet bénéfique ou au contraire délétère. Chez les patients répondeurs, une hypothèse est que la NAC, à l'instar de TOLLIP, inhiberait la réponse inflammatoire liée à l'activation des TLR-4, et augmenterait la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Ces effets sont retrouvés lors de la transplantation hépatique, où la NAC est utilisée afin de limiter l'inflammation ([Santiago 2008](#)). Les mécanismes cellulaires menant à un effet délétère de la NAC chez les patients atteints de polymorphisme défavorable de TOLLIP ne sont pas définis.

La dégradation de la matrice extracellulaire joue un rôle important dans la pathogenèse de la FPI. Cette pathologie se caractérise par un déséquilibre de la balance entre les métalloprotéases matricielles (MMP) et les inhibiteurs des MMP (TIMP) (pour revue [Selman 2002](#)). Ce déséquilibre va provoquer une accumulation des composantes de la MEC et entraîner une désorganisation de l'architecture pulmonaire. Des polymorphismes du gène codant la métalloprotéase matricielle MMP-9 ont été identifiés chez des patients atteints de FPI, faisant varier la réponse des patients aux glucocorticoïdes ([Zhang 2015](#)). Le traitement permet de diminuer la présence de MMP-9 dans le sérum des patients, quel que soit leur profil génétique. Cependant, le traitement se révèle être plus efficace dans un groupe de patients possédant certains allèles (génotype CC). Les mécanismes impliqués restent cependant à explorer.

1.3.1.4. Traitements actuels

Deux molécules anti-fibrosantes sont actuellement utilisées dans la prise en charge des patients atteints de FPI. La pirfénidone présente des propriétés anti-fibrosantes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires, malgré des mécanismes d'action mal élucidés (pour revue [Hilberg 2012](#)). Dans des modèles animaux de fibrose, la pirfénidone diminue la production de facteurs profibrosants (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance comme le TGF- β ou le TNF- α) ([Iyer 1995](#), [Oku 2008](#), [Tanaka 2012](#)). Elle permet également de diminuer le recrutement de fibrocytes impliqués dans la fibrogénèse ([Inomata 2014](#)). In vitro, la pirfénidone semble inhiber la protéine HSP-47 (Heat Shock Protein), chaperonne spécifique du collagène, conduisant à la baisse de la production de collagène de type I par les fibroblastes ([Nakayama 2008](#)).

L'autre molécule anti-fibrosante ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe est le nintédanib, un agent anti-tumoral (inhibiteur de récepteurs tyrosine kinase), qui inhibe in vitro la migration et la prolifération des fibroblastes (sains et de fibrose), ainsi que leur activation en myofibroblastes, induites par les facteurs PDGF-BB, FGF-2 and VEGF. La plus faible accumulation de fibroblastes et myofibroblastes aboutit ainsi à la baisse de dépôt de matrice extracellulaire ([Wollin 2014](#)).

Un reflux gastro-œsophagien acide anormal est commun chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Des études rétrospectives ont montré une amélioration des résultats chez les patients recevant un traitement anti-acide ([Lee 2013a](#)).

Des traitements antibiotiques sont prescrits lors d'exacerbations aiguës afin d'empêcher des infections bactériennes. Afin de stopper la phase d'exacerbation aiguë, aucun traitement n'a montré son efficacité. Des corticoïdes peuvent être utilisés. Ce traitement, avec de nombreux effets secondaires observés, ne permet cependant d'améliorer la capacité ventilatoire que dans 10% des cas ([Flaherty 2001](#)). En complément des corticoïdes, un immunosuppresseur peut être indiqué (cyclophosphamide ou azathioprine). L'efficacité de ces traitements, déjà modeste, est remise en cause par une étude récente, montrant une diminution de la survie des patients traités à l'aide de stéroïdes et d'immunosuppresseurs lors de phases d'exacerbations aiguës ([Papisiris 2015](#)).

Pour les patients âgés de moins de 65 ans, la transplantation pulmonaire peut être proposée. Chez ces patients, la médiane de survie est estimée à 4,5 ans ([Egan 2005](#)). Cependant, de nombreux patients décèdent en étant sur liste d'attente de greffe ([Bennett 2015](#)).

1.3.1.5. Essais thérapeutiques et perspectives

L'étude en cours STX-100 est une étude de phase 2, qui a pour objectif d'évaluer l'innocuité, l'immunogénicité, la tolérance de différentes doses de STX-100 et son effet sur des biomarqueurs analysés à partir de lavages broncho-alvéolaires de patients (ClinicalTrials.gov [NCT01371305](#)). Le STX-100 est un anticorps monoclonal humanisé, inhibant l'intégrine $\alpha\beta6$ retrouvée au niveau de zones inflammatoires. Cette intégrine semble jouer un rôle clé dans l'activation du TGF- β 1 et dans l'induction de la fibrose ([Puthawala 2008](#), [Lo 2013](#)).

L'inefficacité (et même la nocivité) des immunosuppresseurs a clairement été démontrée au cours de la FPI ([IPFCRN, Raghu 2012 et al.](#)). Des essais cliniques bien conduits et de

grande envergure n'ont pas montré de bénéfice significatif pour les médicaments suivants : anti-TNF α (Etanercept) ([Raghu 2008](#)), IFN- δ 1b ([King 2009](#)), anti-tyrosine kinase (Imatinib mesylate) ([Daniels 2010](#)).

Certains vasodilatateurs se sont également révélés inefficaces : antagonistes des récepteurs de l'endotheline-1 (Bosentan, Macitentan, Ambrisentan) (pour revue [King 2011](#)), inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 (Sildenafil) ([IPFCRN, Zisman 2010 et al.](#)).

Plus récemment un anti-coagulant oral (anti-vitamine K, la warfarine) ([Noth 2012](#)) et la N-acétylcystéine (NAC) ([IPFCRN, Martinez 2014 et al.](#)) ont été testés sans succès. En effet, malgré les connaissances physiopathologiques sur le niveau élevé de stress oxydant dans le poumon de FPI ([Kinnula 2005](#)), la prise à fortes doses de NAC semble non seulement ne pas être bénéfique mais serait associée à une plus grande fréquence d'événements cardiovasculaires ([IPFCRN, Martinez 2014 et al.](#)).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentant un intérêt thérapeutique majeur (voir Partie 4). Les études sur l'animal (souris, rat, hamster) ont montré l'innocuité des CSM, et leur efficacité sur la réduction de l'inflammation, la diminution de la sécrétion de collagène par les fibroblastes, la diminution de la sévérité de la fibrose et l'augmentation de la survie des animaux ([Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#), [Ortiz 2007](#), [Moodley 2009](#)). Des cellules souches mésenchymateuses sont retrouvées dans le poumon humain, et participerait au maintien de l'homéostasie après transplantation chez l'animal ([Kajstura 2011](#)).

Chez l'homme, des études de phase 1 ont également été réalisées, dont une en 2013 conduit par Weiss, sur des patients atteints de bronchopneumopathie obstructive chronique, rapportant l'innocuité des MSC ([NCT00683722](#), [Weiss 2013](#)). Concernant la FPI, des études de phase 1 chez l'homme sont actuellement en cours ([NCT01919827](#), [NCT01385644](#), [NCT02013700](#), [Antunes 2014](#)).

Une alternative à la transplantation pourrait voir le jour grâce aux poumons bio-artificiels. Le procédé consiste à prélever un poumon, de lui retirer toutes ces cellules (décellularisation) pour ne garder que l'architecture pulmonaire. Ensuite, à l'aide d'un bio-réacteur, de nouvelles cellules pulmonaires autologues vont recoloniser et reformer un poumon sain et fonctionnel. Cette technique récente, expérimentée sur le rat apporte des résultats encourageants ([Petersen 2010](#), [Ott 2010](#)). La décellularisation de poumon est également possible sur des organes humains et porcins ([Nichols 2013](#)).

Un autre projet de poumon artificiel portatif, fonctionnant tel un dialyseur respiratoire, sera développé chez l'Homme en 2020 dans une étude pilote en France, qui sera dirigée par le Pr Mercier (projet BIOART-LUNG 2020).

1.3.2. Le syndrome de détresse respiratoire aigüe

1.3.2.1. Epidémiologie

Le syndrome de détresse respiratoire aigüe, ou SDRA, est une forme de défaillance pulmonaire sévère, consécutive à une altération de la perméabilité capillaire, où la fonction respiratoire n'est plus assurée. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1967 chez des soldats américains pendant la guerre du Vietnam ([Ashbaugh 1967](#)). Les premiers critères de classification ont été définis en 1994, caractérisant le SDRA comme un infiltrat pulmonaire bilatéral à la radiographie du thorax [Figure 10] associé à une hypoxémie artérielle sévère ([Bernard 1994](#), [ARDS DTF & Ranieri 2012](#)).

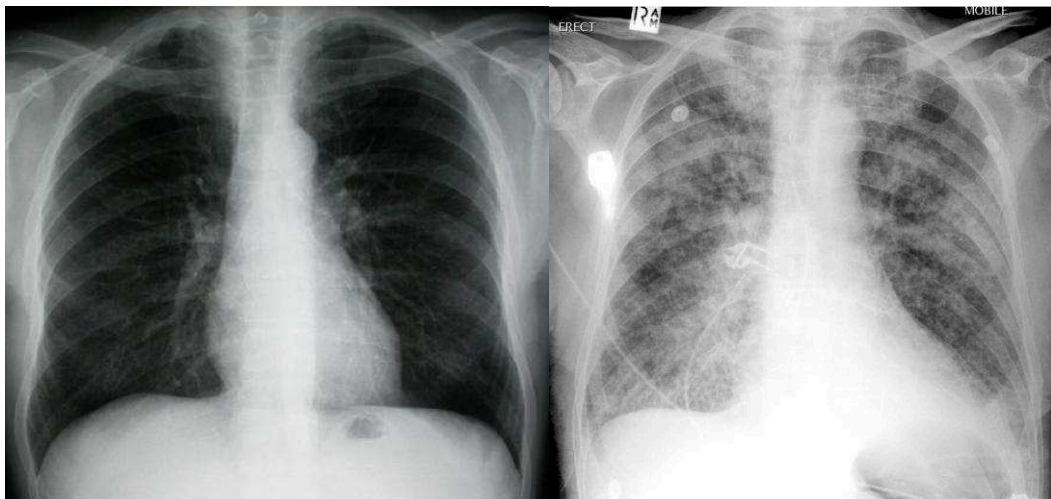


Fig 10. Radiographies thoraciques. *Poumons sains (à gauche) et poumons atteints d'un œdème aigu (à droite) (radiopaedia.org, decas.univ-nantes.fr)*

L'incidence du SDRA est estimée à 15-34 cas / 100 000 habitants par an. La mortalité reste élevée, avec un taux de décès à l'hôpital estimé à environ 38.5% ([Rubenfeld 2005](#)).

Les causes de SDRA sont multiples. Dans la moitié des cas, ce syndrome apparaît suite à une agression directe du poumon (embolie, inhalation d'acide gastrique, de gaz toxiques...). Dans 20% des cas, un SDRA fait suite à une cause extra-pulmonaire (sepsis, pancréatite

aigüe...) (pour revue [Brun-Buisson 2004](#)). Le SDRA est considéré comme un œdème pulmonaire lésionnel, secondaire à un processus inflammatoire aigu.

1.3.2.2. Histologie et physiopathologie

Le SDRA est caractérisé par une accumulation de fluides riches en protéines et en neutrophiles dans l'interstitium et les alvéoles pulmonaires suite à des dommages de la barrière alvéolo-capillaire [Figure 11]. Une accumulation de neutrophiles activés au niveau des vaisseaux pulmonaires conduit à une perte d'intégrité de la barrière endothéliale ([Fowler 1984](#)). Bien qu'une atteinte de l'endothélium pulmonaire soit un pré-requis, elle n'est en général pas suffisante pour déclencher un SDRA. En effet, une agression de l'épithélium alvéolaire est également nécessaire, vraisemblablement là aussi en raison d'une accumulation de neutrophiles activés dont les sécrétions endommagent l'épithélium ([Zemans 2009](#)).

Dans le SDRA, la capacité du poumon à évacuer l'œdème est fortement réduite suite à la perte d'intégrité de l'épithélium alvéolaire. En effet, la perte massive de pneumocytes I et II par apoptose et nécrose, associée à une diminution de l'activité et de l'expression des canaux ENaC, CFTR et Na/K-ATPase par les pneumocytes entraînent une baisse de la clairance alvéolaire ([Albertine 2002](#), [Ware 2001](#), [Lee 2007](#), [Folkesson 2006](#)). En revanche, chez les patients atteints d'un œdème cardiogénique pur, la fonction de réabsorption de l'œdème est maintenue car l'épithélium alvéolaire n'est pas atteint ([Vergheze 1999](#)).

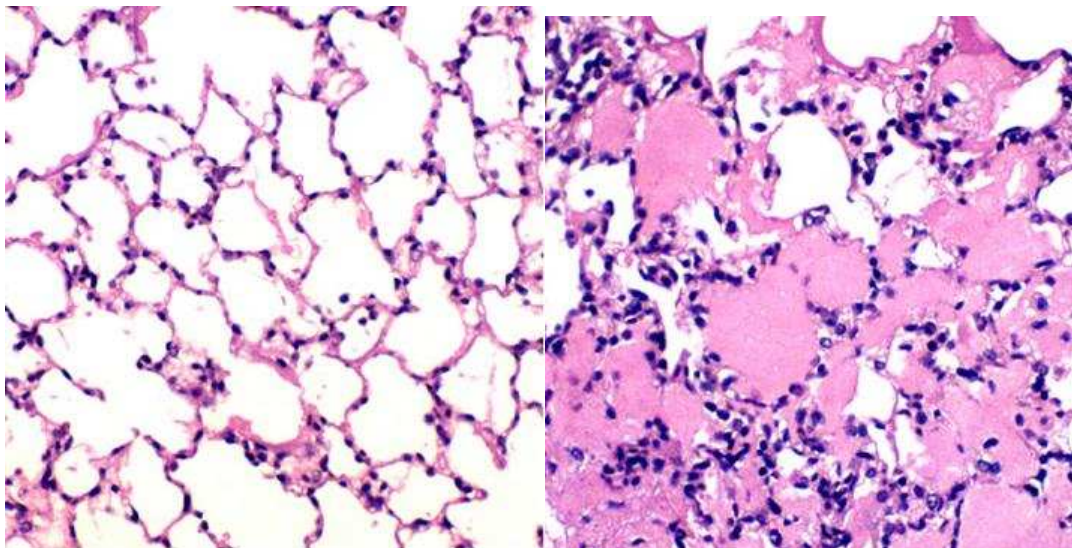


Fig 11. Coupe histologique de biopsie pulmonaire. Sujet contrôle (à gauche) et patient atteint d'œdème pulmonaire (à droite), caractérisé par la présence de fluide dans les alvéoles (en rose). Marquage éosine/hématoxyline ([Matthay 2014](#)).

L'évolution du SDRA se détaille en 3 parties (pour revue [Bellingan 2002](#), pour revue [Matthay 2011](#)) :

1.3.2.2.1. La phase aiguë exsudative

L'épisode aigu dure entre 1 et 6 jours. Un œdème alvéolaire et interstitiel est présent. Il y a une accumulation de neutrophiles, de macrophages et d'hématies dans l'alvéole. Les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, qui vont activer les neutrophiles et stimuler la production de collagène par les fibroblastes [Figure 12]. Les neutrophiles, jouant un rôle dans la capture des pathogènes, libèrent également des facteurs potentiellement délétères à fortes concentrations, comme des protéases (MMP, élastase) des ROS et des molécules pro-inflammatoires.

Les facteurs pro-inflammatoires libérés au niveau alvéolaire, les bactéries, les virus ou encore l'hypoxie (ci-dessous) réduisent la clairance alvéolaire. L'activité du canal sodique ENaC diminue notamment en raison d'une baisse de l'expression de la sous-unité α ENaC impliquant la voie MAPK induite par l'IL-1 β ou le TGF- β ([Roux 2005](#), [Frank 2003](#)). Le TNF- α réduit également l'activité et l'expression des sous-unités d'ENaC ([Dagenais 2004](#)).

L'œdème, riche en protéines, va inactiver le surfactant. Des anomalies quantitatives et qualitatives du surfactant, détectées chez les patients, aggrave le collapsus alvéolaire dans les régions lésées ([Gregory 1991](#), [Lewis 1993](#), [Greene 1999](#)). D'autre part, des lésions importantes au niveau de l'alvéole induisent une dénudation de la membrane basale, remplacée de manière provisoire par une membrane hyaline composée notamment de fibrine, de débris cellulaires, des protéines plasmatiques (albumine, fibronectine) et de composants du surfactant (pour revue [Castro 2006](#)). Des fibroblastes et myofibroblastes migrent depuis l'interstitium dans l'espace alvéolaire, sous l'influence potentielle de la fibronectine ([Fukuda 1987](#)).

1.3.2.2.2. La phase proliférative

Durant les 7 à 14 jours suivants la phase aiguë de SDRA, des indices montrent qu'une réparation se met en place, les PII prolifèrent et se transdifférencient afin de rétablir la barrière alvéolo-capillaire lésée par la perte des PI. L'œdème se résorbe grâce au transport actif ionique transépithélial. Les fibroblastes vont progressivement remplacer la fibrine par les fibres de collagène dans l'espace alvéolaire, mais possiblement aussi dans l'interstitium, réduisant la lumière des voies respiratoires (pour revue [Matthay 2011](#)).

1.3.2.2.3. La phase résolutive

Après le 14^{ème} jour, les neutrophiles et pneumocytes II en excès sont éliminés par apoptose, comme les fibroblastes et les cellules endothéliales infiltrés ([Matute-Bello 1997](#), pour revue [Bellingan 2002](#)). Le collagène de type III est dégradé par les métalloprotéases (MMP) et remplacé par du collagène de type I plus résistant ([Raghu 1985](#)). La barrière alvéolo-capillaire redevient imperméable, l'œdème se résorbe totalement. Dans la majorité des cas, les patients récupèrent complètement leur capacité respiratoire dans les 6 mois suivants le SDRA ([McHugh 1994](#)).

Cependant, des séquelles sont retrouvées chez certains patients. Des microthrombus peuvent avoir été formés par les plaquettes au niveau des lésions endothéliales, conduisant à une diminution de l'efficacité des échanges gazeux. Un début de fibrose peut survenir. La présence résiduelle de collagène, fortement synthétisée pendant la phase aiguë du SDRA et non dégradée ensuite par les MMP, peut être due à une dérégulation entre les MMP et leurs inhibiteurs (TIMP). Par conséquent, le poumon se rigidifie, diminuant ainsi la compliance pulmonaire. On peut relever une hypoxémie, c'est à dire une diminution de la quantité d'oxygène transportée dans le sang, du fait de l'épaississement de la barrière alvéolo-capillaire, et de la perte d'un nombre plus ou moins important d'alvéoles (pour revue [Bellingan 2002](#)).

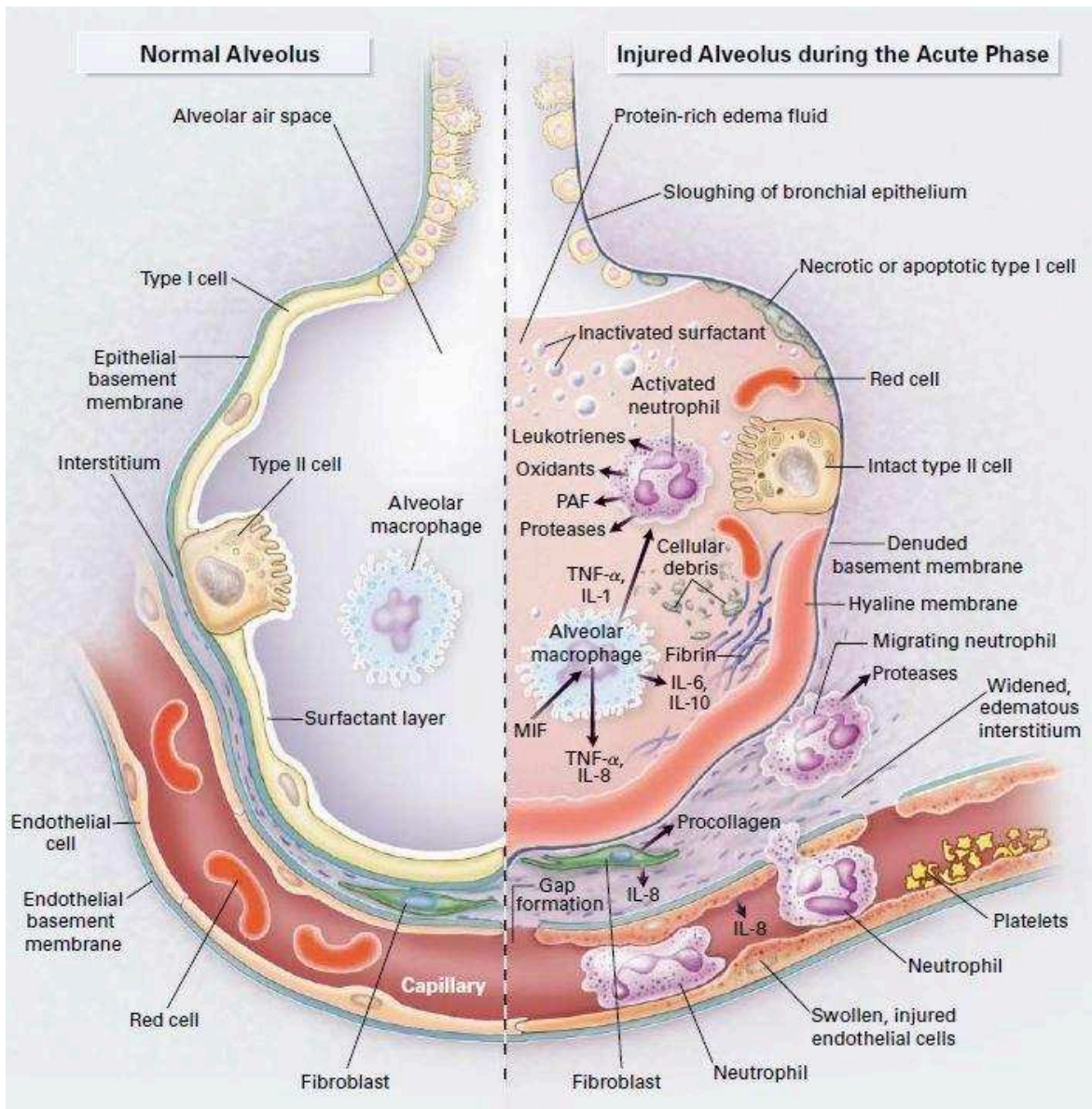


Fig 12. Schéma de la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aiguë (Ware 2000).

1.3.2.3. Facteurs de risque

Un passé d'éthylisme chronique favorise la survenue d'un SDRA, tout comme l'exposition à la fumée de tabac (Moss 2003, Calfee 2011).

Les polymorphismes génétiques sont fortement impliqués dans l'apparition et le développement du SDRA.

Une vingtaine de gènes a également été retrouvée comme étant impliqués dans les processus de réparation épithéliale après lésion sévère, à savoir la régulation de l'inflammation, la coagulation, la fonction endothéliale, l'apoptose (pour revue [Gao 2009](#)).

Les analyses d'associations pan-génomiques récentes ont identifié le gène PPFIA1, qui code la liprine α , une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire, les interactions cellules-matrice. Les personnes ayant un polymorphisme défavorable pour ce gène ont un risque accru de déclencher un SDRA suite à un traumatisme ([Christie 2012](#)). L'analyse de la liprine issue des variants du gène PPFIA1 permettra de préciser les changements qualitatifs ou quantitatifs de la protéine « déficiente ».

Speert considère que la susceptibilité génétique aux infections représente un facteur de risque important dans la probabilité de développer un SDRA ([Speert 2008](#)). Certains patients sont déficients en Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 (IRAK-4, une kinase impliquée dans la réponse immunitaire innée), les rendant plus susceptibles aux infections ([Ku 2007](#)). D'autres polymorphismes sont associés à un risque accru d'infections pulmonaires, touchant les TLR, les chimiokines (gènes DARC, CXCL8), les mécanismes de régulation intracellulaires ([Kangelaris 2012](#), [Meyer 2011](#)).

Des variations du gène codant la protéine Fas, impliquée dans l'apoptose ont été décrites chez des patients atteints de SDRA. L'étude montre que les personnes possédant un polymorphisme défavorable de Fas avaient une plus grande susceptibilité à développer un SDRA, sans pour autant influencer sur la sévérité et la mortalité ([Glavan 2011](#)). Cette susceptibilité pourrait passer par une augmentation de l'expression de Fas dans différents types cellulaires, comme dans les monocytes et leucocytes ([Glavan 2011](#)).

Des marqueurs peuvent orienter le diagnostic et la prise en charge rapide des patients présentant une atteinte aiguë du poumon (ALI) (forme moins sévère que le SDRA) et soulignent le caractère inflammatoire et lésionnel au niveau épithélial du SDRA. Les biomarqueurs prédictifs concernent des marqueurs inflammatoires (IL-6, IL-8), des marqueurs épithéliaux (SP-D), des marqueurs d'adhésion, des marqueurs de lésions endothéliales, de la MEC (desmosine), ou encore des protéines de la coagulation (protéine C, PAI-1) (pour revue [Spragg 2010](#)).

1.3.2.4. Traitements actuels

A l'heure actuelle il n'existe aucun traitement efficace pour traiter le SDRA. Les soins consistent à sédaté, intuber et ventiler à haute fréquence et à petit volume le patient. La ventilation mécanique permet de garder les alvéoles ouvertes, en maintenant une pression résiduelle dans les voies aériennes pendant l'expiration ([Muscedere 1994](#)).

1.3.2.5. Essais thérapeutiques

Les β -agonistes, connus pour stimuler l'adressage d' α ENaC à la membrane, sont intéressants in vitro car ils pourraient favoriser la clairance du fluide alvéolaire, réduit notamment par le TGF- β ou l'hypoxie ([Frank 2003](#), [Planès 2002](#)). Malheureusement, l'utilisation de salbutamol n'a pas été retenue, n'apportant aucun bénéfice aux patients ([Gates 2013](#)).

Les cellules souches mésenchymateuses, par leurs nombreux effets bénéfiques, représentent un intérêt thérapeutique dans la prise en charge des patients atteints de SDRA (pour revue [Lee 2011](#)). Les études précliniques ont montré que les CSM, ou l'utilisation de leur milieu conditionné, améliorerait la fonction pulmonaire en stimulant la clairance alvéolaire et la réparation de l'épithélium alvéolaire [Figure 13] ([Lee 2009a](#), [Goolaerts 2014](#)). Les CSM ont in vitro un effet antibactérien, immunomodulateur, notamment en induisant une diminution de la sécrétion dans le plasma de médiateurs inflammatoires (dont le TNF α , MIP-2, IFN-g, IL-1b, MIP-1a, IL-6, IL-8,), améliorent la survie des pneumocytes en leur transférant des mitochondries et en sécrétant des facteurs solubles cytoprotecteurs (ci-dessous) (pour revue [Antunes 2014](#), pour revue [Bhattacharya 2013](#), pour revue [Lee 2011](#)).

Chez l'homme, l'utilisation des CSM fait actuellement l'objet de deux études de phase 1 et 2 ([NCT01775774](#), [NCT01902082](#)).

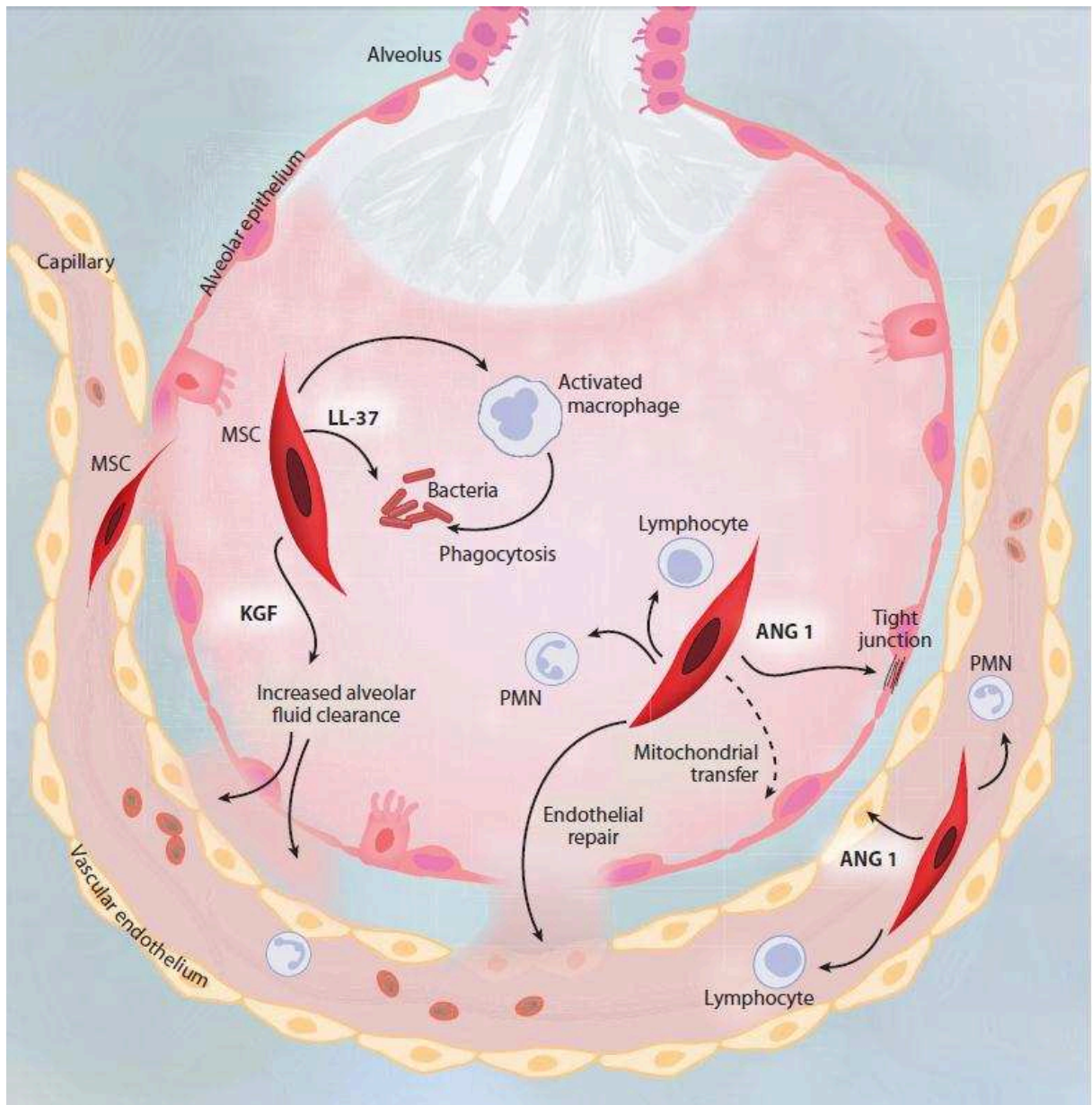


Fig13. Schéma présentant les différents effets bénéfiques des CSM dans l'alvéole pulmonaire dans un cas de SDRA (Lee 2011).

2. Réponses cellulaires à l'hypoxie

L'oxygène (O_2) est un élément vital pour toutes les cellules de notre organisme. En effet, il est le comburant indispensable à la respiration mitochondriale qui permet la production d'une grande quantité d'ATP, l'énergie nécessaire aux réactions enzymatiques et aux processus biologiques de nos cellules. En absence d' O_2 , la fabrication de l'ATP persiste (grâce à la fermentation lactique) mais elle est très réduite (2 molécules d'ATP seulement sont obtenues pour une molécule de glucose contre 38 lorsque la respiration mitochondriale est mise en jeu), affectant donc grandement le fonctionnement cellulaire. Le maintien d'un approvisionnement stable en O_2 est fondamental pour le fonctionnement optimal de nos organes. En effet, une baisse d'approvisionnement (hypoxie) est néfaste car elle se traduit par une baisse de production en ATP. Cependant, un apport excessif en O_2 (hyperoxie) est également délétère pour nos cellules car il est synonyme de stress oxydatif. Il est donc important que nos cellules puissent s'adapter et se protéger face à des modulations d'apport en O_2 .

En situation physiologique, les pneumocytes sont très bien oxygénés, puisque directement en contact avec le gaz alvéolaire dont la pression partielle moyenne en O_2 est de 100 mmHg. Cependant, les principales pathologies du poumon distal s'accompagnent en général d'une hypoxie alvéolaire, soit du fait de l'existence d'un œdème alvéolaire comme au cours du SDRA, soit du fait du remaniement du parenchyme pulmonaire comme au cours de la FPI.

2.1. L'hypoxie

L'hypoxie survient lorsque la quantité d'oxygène délivrée aux tissus est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires. Ce stress subit par l'organisme peut être dû à l'altitude ou être la conséquence de pathologies tel que l'anémie, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance respiratoire par exemple. D'autres éléments peuvent déclencher une hypoxie, comme une intoxication au monoxyde de carbone (CO).

En situation d'hypoxie, des adaptations vont s'effectuer à plusieurs niveaux afin de tenter de rétablir un apport normal d'oxygène et de limiter la consommation d'oxygène :

- A l'échelle de l'organisme, la ventilation et le débit cardiaque augmentent rapidement, et l'érythropoïèse est stimulée.
- Au niveau des organes, en cas d'ischémie, une néoangiogenèse est induite via l'expression de VEGF afin de pallier à la diminution de l'apport sanguin. De plus, la stimulation de l'érythropoïèse, via l'expression d'EPO, permet d'améliorer le transport d'oxygène aux tissus. Au niveau pulmonaire, une vasoconstriction des artères pulmonaires se produit au niveau des bronchioles terminales hypoxiques afin de détourner le débit sanguin vers les zones correctement ventilées.
- Au niveau cellulaire, une modification d'activité de certaines protéines se produit, ainsi qu'une régulation (stimulation/répression) de l'expression de nombreux gènes.

Nous allons nous intéresser ici à l'effet de l'hypoxie au niveau cellulaire, caractérisé par l'activation des facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF (Hypoxia-Inducible Factor). Ainsi, en réponse à l'hypoxie, un programme génique orchestré par les facteurs de transcription HIF se met en place ([Wang 1993a](#)). Ces facteurs modulent l'expression de 70 à 200 gènes selon les cellules, afin d'adapter leur métabolisme aux conditions hypoxiques ([Tzouveleakis 2007](#), [Semenza 2004](#), pour revue [Kaelin 2008](#)).

D'une part, les mécanismes consommant beaucoup d'énergie vont être inhibés. Ainsi, la synthèse protéique est réduite de 5 à 40% ([Guppy 1999](#)). La transcription des gènes codants les sous-unités de transporteurs du sodium, Na, K-ATPase et ENaC, est diminuée ([Planès 1997](#)). D'autre part, la production d'ATP est optimisée. L'entrée du glucose dans les cellules est facilitée grâce à l'augmentation de l'expression des transporteurs GLUT1 ([Ouidir 1999](#)). La transcription des gènes codant les enzymes de la glycolyse est augmentée (comme l'hexokinase, la GAPDH, la PGK) (pour revue [Clerici 2009](#)). La production d'ATP est ainsi préférentiellement effectuée par glycolyse anaérobie, limitant ainsi la consommation d'oxygène au niveau mitochondrial.

L'hypoxie va également avoir des effets sur la migration cellulaire, la prolifération, la production d'hormones, de cytokines inflammatoires (pour revue [Semenza 2004](#), pour revue [Clerici 2009](#)).

2.2. Les facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF

HIF appartient à la sous-famille des facteurs de transcription à motifs hélice-boucle-hélice (bHLH : Basic helix Loop Helix) qui contiennent le domaine de dimérisation PAS (Per-Arnt-Sim) [Figure 14].

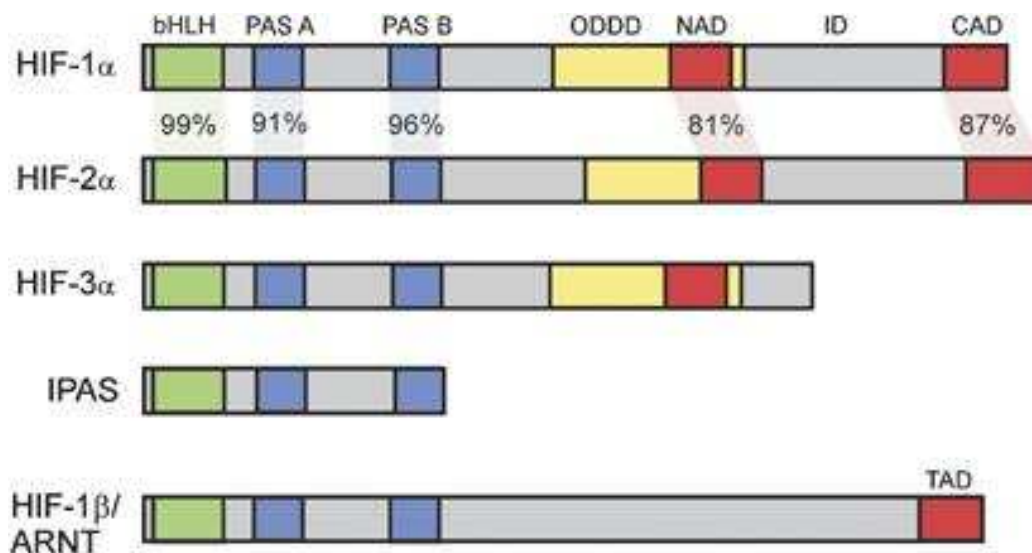


Fig 14. Structure des facteurs de transcription HIF. Les valeurs réfèrent au pourcentage de similarité pour les domaines NAC et CAD entre HIF-1 α et HIF-2 α . Le pourcentage global d'homologie entre HIF- 1 α et HIF-2 α est de 48% chez l'Homme. PAS (Per-Arnt-Sim), NAD (N-terminal Activation Domain), CAD (Carboxy-terminal Activation Domain), TAD (Transactivation Domain), ODDD (Oxygen-Dependant Degradation Domains), ID (Inhibitory Domain) ([Lisy 2008](#))

HIF est un hétérodimère composé d'une sous-unité α cytoplasmique induite par l'hypoxie et d'une sous-unité β nucléaire exprimée de manière constitutive ([Wang 1995a](#), [Tian 1997](#)). La sous-unité β , appelée également « Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator » (ARNT), est impliquée dans la voie de signalisation HIF en tant que partenaire de la sous-unité α . Cette sous-unité peut également se lier à d'autres facteurs en condition normoxique, et participe notamment à la réponse au stress xénobiotique ([Matsushita 1993](#)). Il existe 3 isoformes d'HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α (aussi appelé EPAS1) et HIF-3 α . Selon le type cellulaire, on retrouvera des proportions variables de ces isoformes. Dans les cellules épithéliales alvéolaires, les 3 isoformes sont exprimées ([Wiesener 1998](#), [Li 2006](#), [Fang 2010](#)). Concernant HIF-3 α , 8 variants ont été recensés (notés HIF-3 α 1 à HIF-3 α 8), dont les fonctions

restent peu connues à ce jour, mais interviennent par différents mécanismes dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α et HIF-2 α (pour revue [Duan 2015](#)). Le variant HIF-3 α 2 est également appelé IPAS (Inhibitory PAS Domain Protein). Contrairement à l'IPAS murin représenté sur la [Figure 13], le variant humain possède un domaine ODDD (Oxygen-Dependant Degradation Domains) à l'instar de HIF-3 α 3, et un domaine NAD (voir ci-dessous) (N-terminal Activation Domain) ([Maynard 2003](#)).

Les isoformes HIF-1 α , HIF-2 α , certains variants de HIF-3 α et leur partenaire commun HIF-1 β , partagent différents motifs :

- le motif bHLH (basic Helix-Loop-Helix), caractéristique des facteurs de transcription dimériques. Le motif HLH intervient dans la dimérisation de la protéine avec la sous-unité HIF-1 β , tandis que la région basique qui le précède intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison à l'ADN.
- Les domaines PAS (PER (period circadian protein), ARNT, SIM (single-minded protein)). Ce domaine contribue à la dimérisation de la sous-unité α avec la sous-unité β ([Card 2005](#)).

Les isoformes de HIF- α contiennent les domaines :

- ODDD, une région située entre les acides aminés 401 et 603, et contenant des prolines conservées, reconnues par les prolyl-hydroxylases (PHD) ([Huang 1998](#)).
- NAD (N-terminal Activation Domain) et CAD (Carboxy-terminal Activation Domain), deux domaines de transactivation riches en leucine, situés respectivement en position 531-575 et 786-826 pour HIF-1 α , recrutent des co-activateurs dans le noyau comme CBP/p300, SRC-1 ou TIF-2 (pour revue [Lisy 2008](#)). CAD participe à l'expression de cibles communes à HIF-1 α et HIF-2 α , quand NAD contribue à l'activation de gènes spécifiques à l'un et à l'autre ([Hu 2007](#)). CAD représente une région régulatrice de l'activité de HIF (voir plus bas).

HIF-1 β comprend également un domaine de transactivation (TAD) [Figure 13]. Bien que ce domaine ne semble pas nécessaire à l'activité de HIF- α , il pourrait exercer une activité activatrice propre à HIF-1 β en condition normoxique ([Lee 2004](#)).

2.2.1. Régulation par la voie canonique

En condition normoxique, les sous-unités α de HIF sont en permanence synthétisées par la cellule, mais aussitôt dégradées par le système ubiquitine/protéasome. En effet, les résidus proline (P402 et P564 pour HIF-1 α et HIF-3 α , P405 et P531 pour HIF-2 α) situés sur le domaine ODDD sont hydroxylés par les PHD, en présence d'oxygène (O₂), de 2-oxoglutarate comme substrats, et de Fer (Fe⁺⁺) comme co-facteur [Figure 14] ([Epstein 2001](#), pour revue [Wheaton 2011](#)). La présence d'ascorbate est également nécessaire à l'activité des PHD ([Kivirikko 1998](#), [Knowles 2003](#)). Ces modifications post-traductionnelles permettent l'interaction de HIF- α avec la protéine pVHL (protéine de von Hippel-Lindau), et avec l'ubiquitine ligase VBC-CUL-2 E3. La sous-unité HIF- α est ainsi poly-ubiquitinylée et est adressée au protéasome qui la dégrade [Figure 15] (pour revue [Semenza 2004](#)).

En hypoxie, l'activité des PHD est inhibée, la sous-unité HIF- α n'est plus hydroxylée sur les résidus proline. Ainsi HIF- α est stabilisée et peut s'accumuler dans le noyau où elle interagit avec la sous-unité HIF1- β . HIF- α possède la plus courte demi-vie existante, qui est, in vitro, estimée à une durée inférieure à 5 min dans des cultures cellulaires ([Jewell 2001](#)). En condition d'hypoxie-réoxygénation, la demi-vie de HIF-1 α est inférieure à 1 min ([Yu 1998](#)).

Un autre niveau de régulation de l'activité de HIF- α fait intervenir le facteur inhibant HIF (FIH) ([Mahon 2001](#)). Cette enzyme fonctionnant en présence d'oxygène, de Fe⁺⁺ et d' α -cétoglutarate, hydroxyle HIF- α au niveau d'un résidu Asparagine (N803 pour HIF-1 α et HIF3- α , N851 pour HIF-2 α) situé dans le domaine C-terminal (C-CAD) ([Lando 2002](#)). Cette hydroxylation inhibe, par encombrement stérique, l'interaction de la sous-unité α avec des co-activateurs transcriptionnels. En hypoxie, l'activité du FIH est inhibée, le recrutement de cofacteurs par le dimère HIF- α /HIF- β devient alors possible.

On distingue trois PHD chez les mammifères : PHD1, PHD2 et PHD3 (appelées aussi HPH3, HPH2 et HPH1, ou EGLN2, EGLN1 et EGLN3, respectivement) ([Epstein 2001](#), [Bruick 2001](#), [Taylor 2001](#)). Elles présentent une expression ubiquitaire, avec des niveaux variables selon les tissus. Ainsi, dans le poumon, on retrouve l'expression des PHD2 et PHD3 (pour revue [Bruick 2003](#)). Ces différentes isoformes sont capables d'hydroxyler HIF- α in vitro, avec des spécificités pour différents sites d'hydroxylation ([Appelhoff 2004](#)). PHD2 possède la plus grande activité enzymatique, et joue ainsi un rôle prépondérant dans la régulation de la stabilité de HIF-1 α in vivo et in vitro ([Huang 2002](#), [Berra 2003](#)). Les souris invalidées pour le gène PHD2 ne sont pas viables, l'enzyme jouant un rôle important dans le

développement embryonnaire contrairement à la PHD1 et la PHD3 ([Takeda 2006](#)). Le knock-out conditionnel de PHD2 entraîne une vascularisation accrue, mettant en évidence son importance dans la régulation de l'angiogenèse. PHD1 et PHD3 semblent plutôt impliquées dans la régulation du métabolisme en situation d'ischémie ([Takeda 2007](#), [Adluri 2011](#), [Xie 2015](#), [Aragonés 2008](#)).

Parmi les co-activateurs, on distingue CBP/p300 (ou CREB-binding protein/E1A binding protein P300), ayant une activité Histone Acetyl-Transferase (HAT) favorisant la transcription génique ([Schofield 2004](#)). Le complexe HIF peut également avoir comme co-facteurs Ref-1/Ape (Redox effector factor-1/apurinic/aprimidinic endonuclease), qui facilite le recrutement de p300 et la fixation du complexe à l'ADN ([Ziel 2004](#)). Ref-1 apparaît également nécessaire au recrutement d'autres co-activateurs comme SRC-1 et d'autres protéines de la famille des p160, STAT3 par CBP/p300 ([Carrero 2000](#)). Enfin, dans diverses lignées cellulaires, STAT3 phosphorylé s'intègre au complexe HIF, en se fixant sur CBP/p300, pour augmenter son activité transcriptionnelle ([Gray 2005](#)).

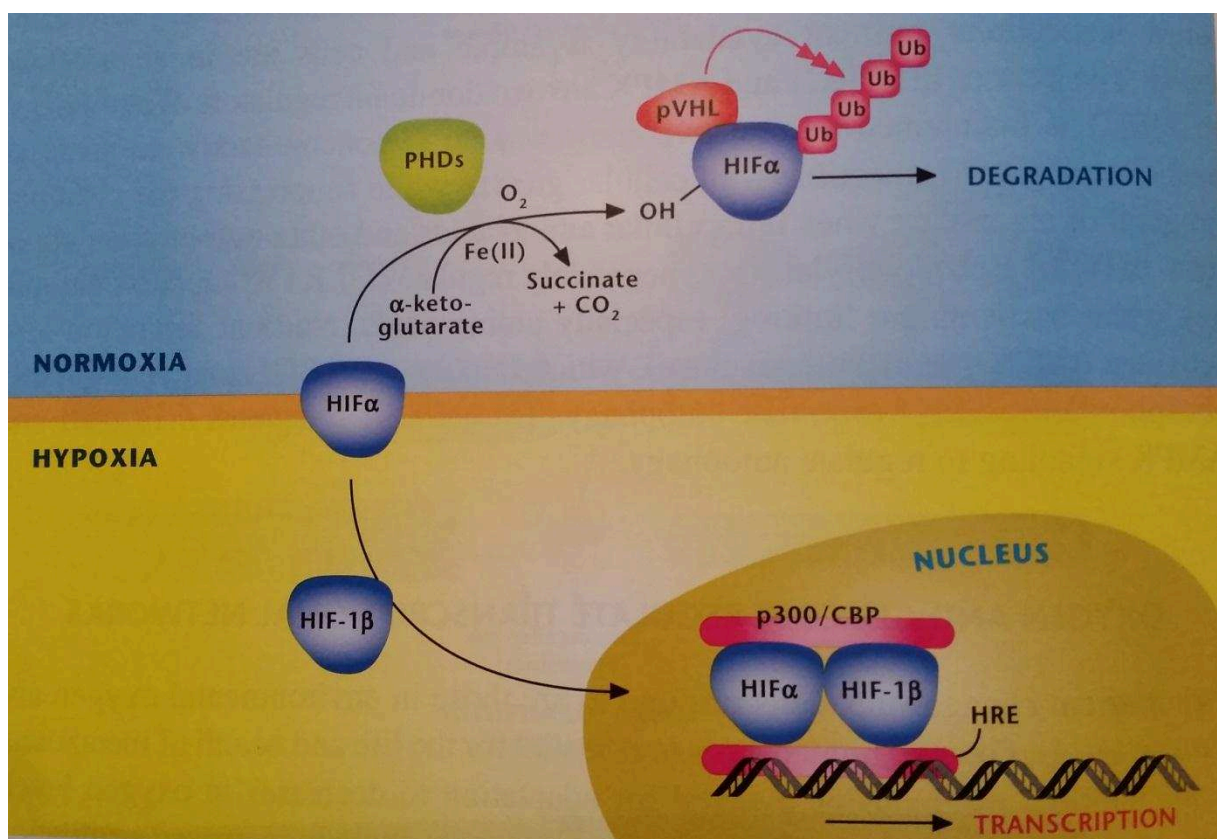


Fig 15. Régulation de HIF selon le taux d'oxygène intracellulaire. HIF est constitué d'une sous-unité β stable de manière constitutive, et d'une sous-unité α dépendante du taux d'oxygène. ([Chandel 2015](#), « Navigating Metabolism », CSH press).

La culture de cellules en hypoxie permet d'induire la stabilisation de HIF in vitro, mais il est possible d'étudier HIF en normoxie en utilisant des agents chimiques inhibant l'activité des PHD. C'est le cas du chlorure de cobalt (CoCl_2) un inhibiteur compétitif du fer ([Epstein 2001](#)). Par ailleurs, le CoCl_2 induit une diminution de la quantité d'ascorbate intracellulaire, molécule nécessaire pour maintenir l'état de fer à un état réduit (Fe^{++}) ([Salnikow 2004](#)). Par ailleurs, le CoCl_2 inhibe l'interaction de pVHL à HIF, en se fixant sur son site de fixation ([Yuan 2003](#)). Le CoCl_2 inhibe fortement le FIH, permettant l'activité de HIF- α , même lorsque le CoCl_2 est utilisé à de faibles concentrations et n'induisant pas sa stabilisation ([Hirsilä 2005](#)).

De même, HIF- α est stabilisé à l'aide de la desferrioxamine (DFO) un chélateur du fer, ainsi qu'en utilisant le 2-OG-dependent dioxygenase inhibitor dimethyloxalylglycine (DMOG), un mimétique du 2-oxoglutarate, cofacteur des PHD ([Agani 1998](#), [Wang 1993b](#), [Hanson 2003](#)).

2.2.2. Régulation par la voie non canonique

La stabilité et l'activité de HIF sont également régulées par d'autres modifications post-traductionnelles, influencées ou non par le taux d'oxygène intracellulaire. Ainsi, l'interaction entre HIF et la protéine chaperonne HSP90 (Heat Shock Protein 90) est nécessaire à la stabilité de HIF. Des inhibiteurs d'HSP90 induisent la dégradation de HIF par une voie indépendante de pVHL et du taux d'oxygène ([Isaacs 2002](#)). Les histones déacétylases (HDAC) stabilisent HIF, en permettant l'interaction de HIF- α avec les protéines chaperonnes HSP70/90 ([Kong 2006](#)). L'acétylation pourrait directement moduler la stabilité de HIF- α . En effet, une lysine située sur le domaine ODDD (K532) serait acétylée par l'Acétylase Arrest-Defective-1 (ARD1) et faciliterait l'interaction de pVHL avec HIF- α ([Jeong 2002](#)). Cependant, la régulation et l'effet de l'ARD1 semblent être variables selon le type cellulaire ([Arnesen 2005](#)).

L'hypoxie induit également la SUMOylation (Small Ubiquitin-related MOdification) des proline P402 et P564 de HIF- α dans le noyau, entraînant sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. Cette modification post-traductionnelle pourrait représenter une autre voie de dégradation de HIF- α , transloqué dans le noyau avant d'avoir été hydroxylé par les PHD. ([Cheng 2007](#)). De plus, la SUMOylation permettrait de diminuer l'activité de HIF-1 α ([Cheng 2007](#), [Berta 2007](#)). Cependant, les premières études surexprimant SUMO-1 montraient une

stabilisation et une augmentation transcriptionnelle de l'activité de HIF-1 α , après SUMOylation des résidus lysines K391 et K477 ([Shao 2004](#), [Bae 2004](#)).

La phosphorylation de HIF-1 α est effectuée par les MAP kinases ERK1/2 sur des acides aminés situés au niveau ou à proximité des domaines NAD ou CAD, et est nécessaire à sa transactivation ([Lee 2002](#)).

Similaire à la phosphorylation, la S-nitrosylation modifie les groupements thiols. La modification de cystéines (Cys800 située sur le domaine CAD, et Cys533 sur le domaine ODD) par l'oxyde nitrique facilite son interaction avec le co-facteur p300 et stimule la transactivation de HIF ([Yasinska 2003](#), [Li 2007](#)).

2.3. L'hypoxie et la production d'espèces réactives à l'oxygène

Les cellules produisent de manière physiologique des dérivés réactifs de l'O₂ (ROS) qui agissent comme seconds messagers dans la cellule, induisant de nombreux phénomènes physiologiques tels que la prolifération, la différenciation, ou l'apoptose. En revanche, une production excessive de ROS peut se produire dans certaines conditions, notamment en hypoxie. Leur accumulation est problématique car les ROS exercent des effets délétères sur les fonctions cellulaires et participe au développement de nombreuses maladies, dont la FPI ([Yanai 2015](#), [Impellizzeri 2015](#)). Ainsi, une étude très récente montre une augmentation du stress oxydant chez les patients sujets à des exacerbations aiguës de la maladie ([Matsuzawa 2015](#)). Par ailleurs, des maladies pulmonaires telles que l'abestose ([Kamp 1992](#)) ou la BPCO ([Rahman 2005](#)) s'accompagnent d'un stress oxydant. Les lésions dues aux ROS paraissent importantes dans la pathogenèse du SDRA (pour revue [Tasaka 2008](#)).

Un des principaux sites de la production de ROS au cours de l'hypoxie est la chaîne respiratoire mitochondriale.

2.3.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries ont un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, ces organelles sont le siège de la respiration cellulaire, processus d'oxydoréduction se déroulant au niveau de la membrane interne de la mitochondrie grâce à une chaîne de complexes protéiques [Figure 16] et permettant, en présence d'oxygène, la production de nombreuses molécules d'ATP, nécessaires aux réactions enzymatiques de nos cellules.

La glycolyse et le cycle de Krebs conduisent à la synthèse de molécules de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et de Flavine Adénine Dinucléotide (FADH₂) ([Krebs, 1937](#)). Ces molécules réductrices sont porteuses d'électrons qu'elles transmettent au complexe I (NADH déshydrogénase) et au complexe II (succinate déshydrogénase) de la chaîne mitochondriale, respectivement. Les électrons sont ensuite transmis à l'ubiquinone (coenzyme Q à l'état oxydé, et ubiquinol QH₂ à l'état réduit) qui les transfère au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase), puis au cytochrome c qui les transmet au complexe IV (cytochrome c oxydase). L'oxygène que nous respirons représente le dernier accepteur de ces électrons et se combine à deux protons pour former de l'eau.

Chaque transfert d'électron au niveau des complexes I, III et IV est associé à un efflux de protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient de pH. Le retour des protons dans la matrice mitochondriale est assuré par l'enzyme ATP synthase qui utilise le gradient électrochimique des protons pour catalyser la phosphorylation d'ADP en ATP [Figure 16].

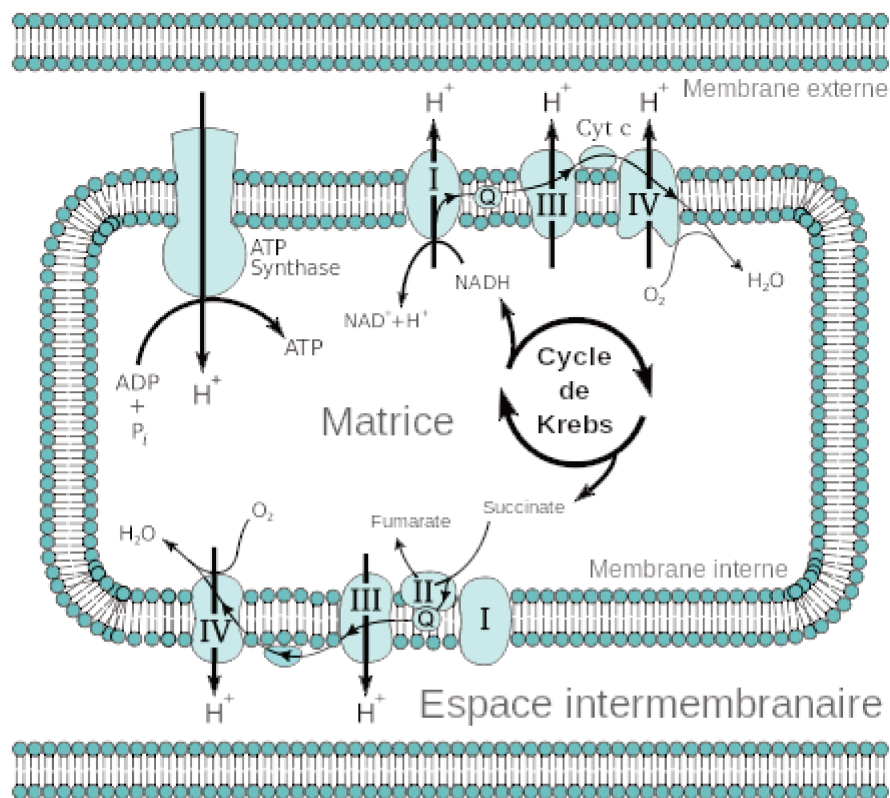


Fig 16. Chaîne mitochondriale de transfert des électrons. Ubiquinone = coenzyme Q, complexe I = NADH,H⁺-coenzyme Q réductase, complexe II = succinate-coenzyme Q réductase, complexe III = coenzyme QH₂-cytochrome C réductase, complexe IV = cytochrome C oxydase, Cyt c = Cytochrome c. (Wikipédia)

2.3.2. Production d'espèces réactives à l'oxygène par la mitochondrie

Malgré une efficacité exceptionnelle de la chaîne respiratoire, la chaîne de transport des électrons entraîne la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ERO ou ROS). Cette machinerie n'est pas un système parfait où tous les électrons provenant du NADH ou du FADH₂ sont transférés au complexe IV et à l'oxygène, accepteur final des électrons. En effet, au niveau des complexes I et III, environ 0.1% des électrons vont réagir de manière non enzymatique avec l'oxygène, pour former l'anion superoxyde O₂⁻ ([Chandel 2015](#), [Guzy 2005](#)). Cependant, la cellule possède un système de défense anti-oxydante qui évite une accumulation délétère de ROS (ci-dessous)

De manière paradoxale, l'hypoxie entraîne, au niveau du complexe III, une surproduction de ROS, dont la quantité varie en fonction du degré d'hypoxie [Figure 17] ([Chandel 1998](#), [Duranteau 1998](#), [Chandel 2000](#)).

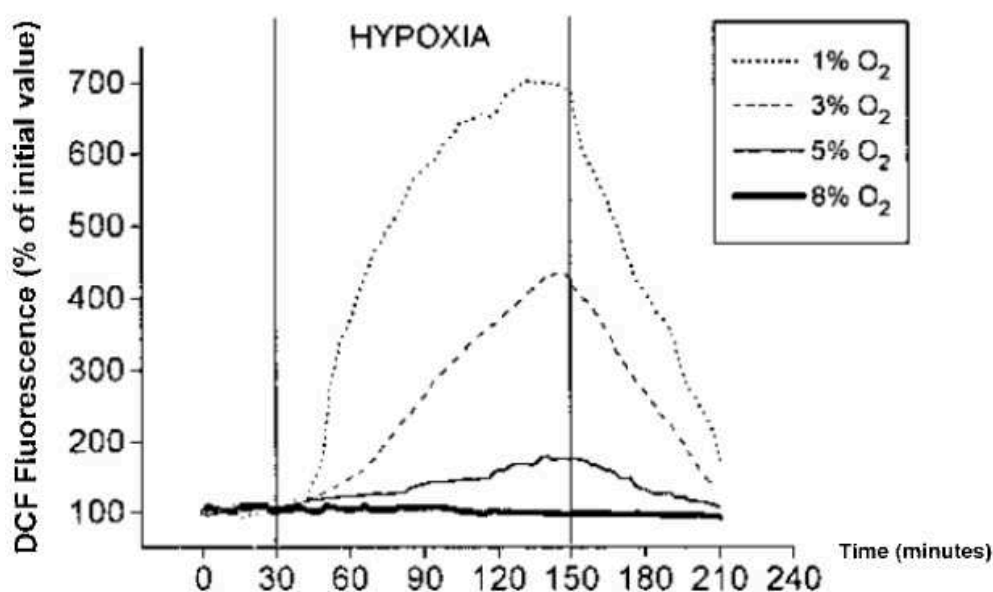


Fig 17. *Effet de l'hypoxie sur la production de ROS.* La fluorescence des cellules Hep3B pour la sonde DCF réagissant avec les ROS intracellulaires a été réalisée à des taux variables d'hypoxie à partir de 30 minutes, pendant 2 heures avant remise en normoxie (21% O₂) ([Chandel 1998](#))

Le complexe I ne semble pas impliqué dans cette augmentation (pour revue [Bleier 2013](#)). A ce jour, le mécanisme menant à cette surproduction de ROS n'est pas encore totalement élucidé. Trois hypothèses permettraient d'expliquer la production d'anion superoxyde [Figure 18] (pour revue [Guzy 2006](#)) :

- L'anion superoxyde, généré de manière physiologique au niveau de la membrane interne, est relargué au niveau de la matrice mitochondriale et en partie dans l'espace intermembranaire. En hypoxie, l'oxygène contenu dans la bicouche lipidique pourrait entraîner un relarguage d'anion superoxyde uniquement au niveau de l'espace intermembranaire.
- L'interaction de l'oxygène avec les protéines et lipides du complexe III pourrait limiter la demie-vie de la semiquinone aux sites Q0 et Q1. En hypoxie, l'activité des cytochromes b serait diminuée, laissant ainsi une durée plus importante à l'électron de la semiquinone pour réagir de manière directe avec l'oxygène et former l'anion superoxyde.
- L'hypoxie, en entraînant des modifications structurales au niveau des protéines du complexe III, pourrait faciliter l'attaque de l'oxygène sur la semiquinone.

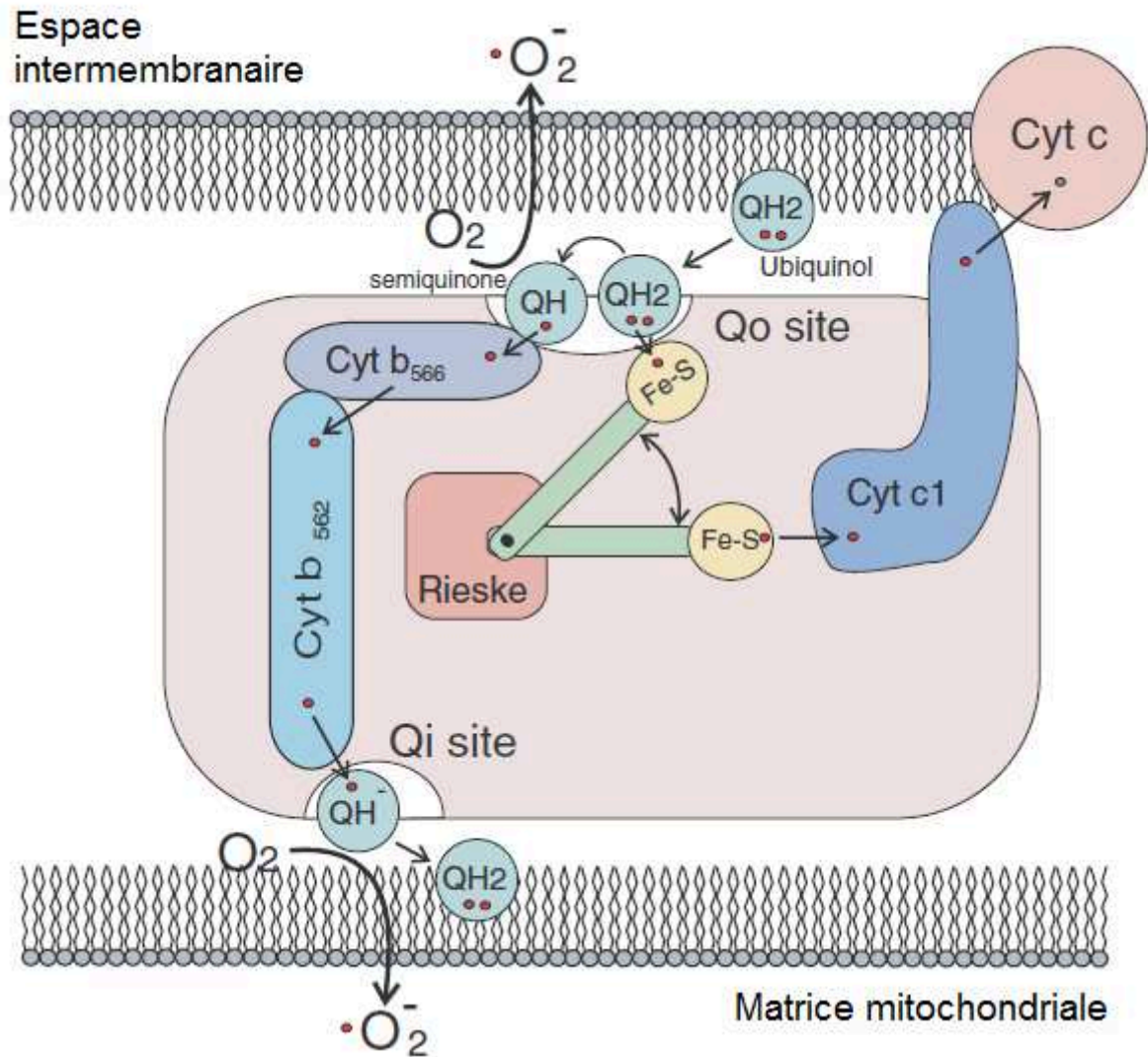


Fig 18. Cycle d'oxydation du coenzyme Q par le complexe III de la chaîne respiratoire. L'ubiquinol QH₂ commence par être oxydé au niveau du site Q₀, où un électron est transféré à une protéine fer-soufre (Ion Sulfur Protein ou ISP) puis au cytochrome c₁ et c pour poursuivre la chaîne de transport des électrons au niveau du complexe IV. L'ubiquinol QH₂, oxydé en semiquinone Q[•] instable va donner son deuxième électron aux cytochromes b. Cet électron va ensuite permettre de régénérer une ubiquinol. Ces réactions entraînent la génération d'anion superoxyde O₂^{•-} (Adapté de [Guzy 2006](#)).

2.3.3. Autres sources de production d'espèces réactives à l'oxygène

D'autres sources de ROS existent dans la cellule. C'est le cas des 6 NADPH oxydases (NOx), présentes dans différents compartiments (endosomes, noyau, réticulum endoplasmique) qui produisent de l'anion superoxyde (pour revue [Crestani 2011](#)). Les NOx semblent impliquées dans la génération de ROS dans les CEA en hypoxie, ainsi que dans la stabilisation de HIF-1 α ([Goyal 2004](#), pour revue [Bedard 2007](#)). Une activité excessive des NOx, délétère dans les CEA, a été décrite ([Kim 2014](#)). Chez la souris, l'expression de NOx4 augmente avec l'âge, et est retrouvée à des taux élevés dans les tissus pulmonaires fibrotiques murins et humains ([Hecker 2014](#)). L'expression de NOx, retrouvée dans les foci fibroblastiques et dans l'épithélium alvéolaire adjacent, semble intervenir dans le développement de la FPI, en jouant un rôle majeur dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, stimulant leur résistance à l'apoptose, et induisant la mort des CEA par apoptose ([Hecker 2014](#), pour revue [Carnesecchi 2012](#)).

La xanthine oxydase (XO), impliquée dans la production d'acide urique au niveau du foie, est également à l'origine d'anion superoxyde. Son activité est présente dans les cellules épithéliales alvéolaires de rats, bien que cette activité soit moindre, comparée aux cellules de l'épithélium bronchique ([Moriwaki 1996](#)).

Par ailleurs, les cellules épithéliales alvéolaires possèdent des peroxysomes ([Kinnula 1992](#)), qui participent à la détoxification de molécules comme l'éthanol, par peroxydation. Ainsi, de par leur activité, les peroxysomes génèrent du peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Néanmoins, ces sources potentielles de ROS semblent jouer un rôle mineur au cours de l'hypoxie.

2.3.4. Les défenses antioxydantes

Un antioxydant est une molécule ou enzyme capable, en petite quantité, de prévenir ou retarder l'oxydation d'un substrat. On peut distinguer deux types de défenses antioxydantes : enzymatiques et non enzymatiques [Figure 19] :

2.3.4.1. Les défenses antioxydantes enzymatiques

2.3.4.1.1. Les superoxydes dismutases

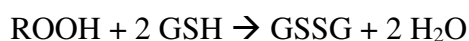
L'anion superoxyde est toxique et doit donc être éliminé. Une première étape de détoxification consiste en une dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H₂O₂, selon la réaction suivante (pour revue [Matés 2000](#)) :



Cette dismutation s'effectue grâce à des métalloprotéines, les superoxydes dismutases (SOD). Chez les mammifères, il existe 3 formes de SOD : une forme cytosolique ayant pour co-facteur le cuivre et le zinc (CuZn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme co-facteur (MnSOD ou SOD2), et une forme sécrétée dans le milieu extra-cellulaire (EcSOD ou SOD3). Cette SOD extra-cellulaire est de type CuZn-SOD et protège les cellules du stress oxydant en se liant aux membranes cellulaires ou dans le collagène de type I. Ces 3 SOD sont exprimées par les cellules épithéliales alvéolaires (pour revue [Zelko 2002](#)).

2.3.4.1.2. La glutathion peroxydase et les peroxyrédoxines

On distingue 8 isoformes de glutathion peroxydase (GPx) codées par différents gènes. Leur expression est ubiquitaire (GPx-1) ou tissu-spécifique (GPx-2 à Gpx-8). On les retrouve dans le cytosol, la mitochondrie, le milieu extra-cellulaire ([Bermingham 2014](#)). Les GPx ont pour substrats des peroxydes (formule R-O-O-R'). La GPx1, élimine le peroxyde d'hydrogène ainsi que des hydroperoxydes (ROOH), ainsi que les lipides peroxydés. La GPx4 utilise spécifiquement les hydroperoxydes phospholipidiques, protégeant la cellule de la peroxydation lipidique. Pour catalyser la réaction, la GPx utilise un donneur d'électron, le glutathion réduit (GSH). Le produit résultant de la réaction est de l'eau.



Le glutathion oxydé (GSSG) est ensuite réduit par une réaction d'oxydoréduction par la glutathion réductase (GR), grâce au NADPH. Le rapport GSH/GSSG est un indicateur de l'état d'oxydation de la cellule.

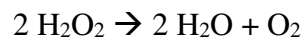
D'autres enzymes appartenant à la famille des thiols peroxydases, abondantes dans le cytosol et la mitochondrie vont également réagir avec l'H₂O₂, comme les peroxyrédoxines (Prx3 et Prx5), la thiorédoxine (Trx2) et la thiorédoxine réductase 2 (TrxR2). L'H₂O₂ est métabolisé à 99.9% par la GPx et les peroxyrédoxines. La Prx3 jouerait un rôle majeur dans cette première étape de détoxification. Parmi le pool d'enzymes mitochondriales, l'analyse de la

concentration enzymatique et de la cinétique de réaction avec l'H₂O₂ aboutit au fait que la Prx3 est responsable à 90% de sa détoxification, tandis que la GPx1 n'interviendrait qu'à hauteur de 9% (pour revue [Cox 2009](#)). Cependant, ce résultat est dû à une grande quantité de Prx3 présent dans les tissus murins étudiés, et pourrait varier selon le type cellulaire et l'espèce étudiée. Dans les cellules épithéliales alvéolaires, à ce jour, seul les effets antioxydants de la Prx6 et la Trx1 ont été publiés ([Wang 2008](#), [Shan 2011](#)).

2.3.4.1.3. La catalase

La catalase est localisée dans le peroxysome et dans le cytoplasme. Cette oxydase utilise le fer ou le cuivre et possiblement le manganèse comme co-facteurs ([Adams 1953](#), [Horsburgh 2002](#)).

La catalase détoxifie l'H₂O₂ en eau selon la réaction suivante :



2.3.4.2. Les défenses antioxydantes non enzymatiques

Le glutathion possède une activité antioxydante propre grâce à son radical thiol (R-SH) qui réagit avec l'H₂O₂ pour former de l'eau et acide sulfonique (RSO₃H). D'autres molécules participent à la détoxification en captant le radical des ROS, comme les vitamines A, C et E, les ubiquinones et les caroténoïdes. La N-acétyl-cystéine (NAC), acide aminé non essentiel, est hydrolysé dans les cellules en cystéine, précurseur du glutathion. Ainsi, la NAC permet de maintenir un pool de GSH élevé dans la cellule. De plus, la NAC réagit directement avec les ROS, essentiellement avec les radicaux hydroxyles OH[•], grâce à son radical thiol ([Aruoma 1989](#)). Le cytochrome c est également capable de capter l'électron instable de l'anion superoxyde, pour être ensuite réduit par la cytochrome c réductase ([Butler 1975](#)).

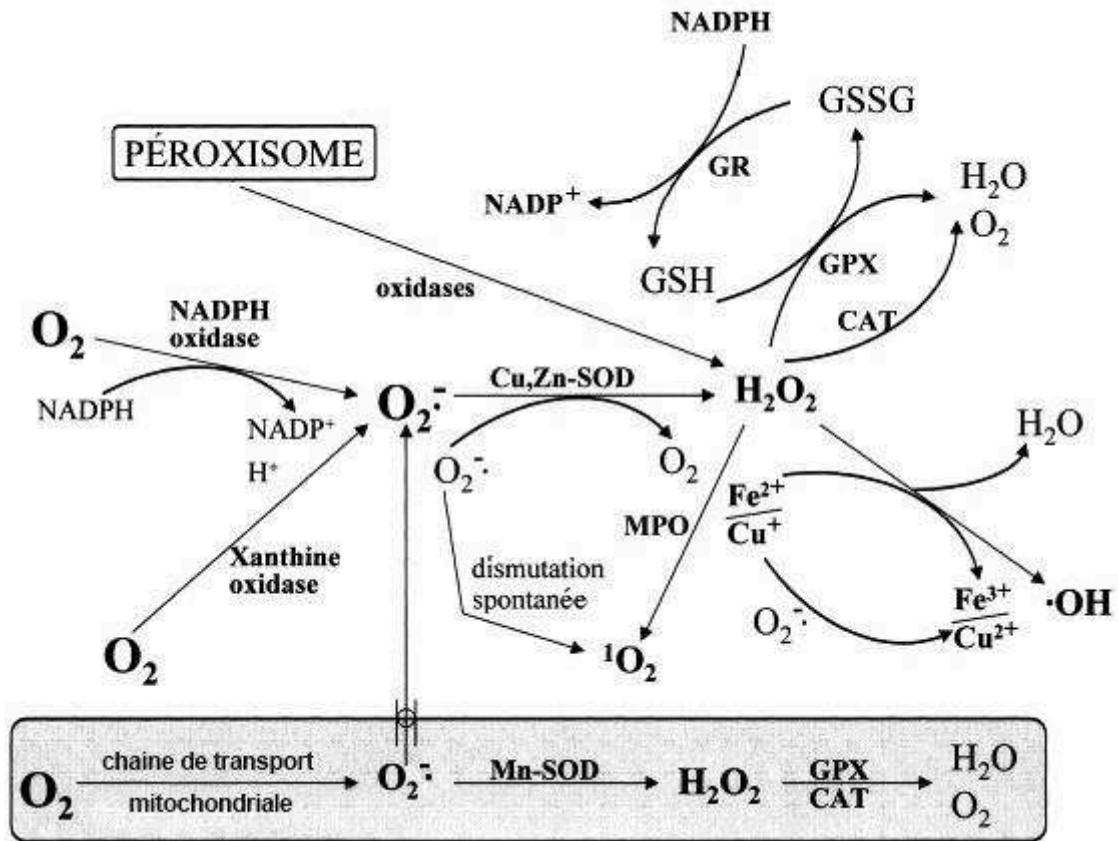


Fig 19. Génération des espèces réactives à l'oxygène, et principaux mécanismes de défense antioxydants (modifié de [Matés 2000](#))

Les ROS qui n'ont pas été détoxifiés vont réagir avec les composants cellulaires, perturbant leur fonction et entraînant des dommages à la cellule. L'anion superoxyde est très réactif mais est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène. L' H_2O_2 qui n'est pas détoxifié va oxyder un atome de Fer (le Fe^{2+}), de Cuivre (Cu^+), ou de Manganèse (Mn^+), et former un radical hydroxyles $\cdot OH$ par la réaction de Fenton (pour revue [Wheaton 2011](#)). Ce ROS est le plus réactif et donc le plus toxique, aussi il est important de limiter au maximum cette réaction d'oxydation.

2.3.5. Les dommages cellulaires induits par les espèces réactives à l'oxygène

Bien que les ROS puissent agir comme des seconds messagers, je m'intéresserai plus particulièrement ici aux fonctions délétères des ROS dans la cellule, constituant un stress oxydant pour la cellule.

2.3.5.1. Peroxydation lipidique

Une fois produits, les ROS peuvent oxyder les lipides insaturés et former des radicaux peroxydes LOO[•]. Cette peroxydation lipidique entraîne une réaction en chaîne avec d'autres lipides très réactifs entre eux, propageant ainsi le stress oxydant dans la cellule. Le malonaldéhyde MDA, un produit de la peroxydation lipidique, ainsi que d'autres dérivés lipidiques, possèdent la capacité de former des ponts avec l'ADN, et provoquer des mutations dans le génome ([Marnett 1999](#)). Le 4-hydroxynonanal (4-HNE), un aldéhyde produit par peroxydation lipidique, est bénéfique à faible dose, mais devient cytotoxique à des concentrations plus élevées, rencontrées lors d'une accumulation pathologique de ROS ([Krokan 1985](#), pour revue [Negre-Salvayre 2010](#)). De manière intéressante, une augmentation de la peroxydation lipidique est observée dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients fumeurs et non-fumeurs atteints de FPI, ainsi que dans le plasma de patients atteints de SDRA ([Rahman 1999](#), [Kumar 2000](#)).

2.3.5.2. Dommages oxydatifs de l'ADN

Les ROS provoquent des cassures double brin au niveau de l'ADN, en oxydant de manière privilégiée les bases guanines pour former majoritairement du 8-Oxo-2'-déoxyguanosine (8-oxo-dG ou 8-OH-dG). Un mécanisme se met en place très rapidement pour réparer l'ADN endommagé et préserver ainsi le matériel génétique. Ce mécanisme implique la kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), qui phosphoryle majoritairement l'histone H2AX sur la sérine 139 du motif SQE (Ser-Gln-Glu) pour donner le γ -H2AX ([Burma 2001](#), [Zha 2008](#)). Cette phosphorylation est un signal permettant le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN.

D'autre part, le génome mitochondrial est particulièrement sensible aux ROS. En effet, l'absence d'histones autour de l'ADN et d'introns rend l'ADN mitochondrial (ADNmt) 50

fois plus susceptible au stress oxydant que l'ADN nucléaire (pour revue [Kim 2015](#)). Les dommages et mutations induites au niveau de l'ADNmt par les ROS, perturbant la fonction mitochondriale et l'homéostasie cellulaire, sont mis en cause dans le développement de la FPI. Un taux d'oxydation de l'ADN important est également détecté chez les patients atteints de SDRA ([Nakamura 2009](#)).

2.3.5.3. Modification des protéines

Les ROS réagissent également avec les résidus cystéines, histidines et lysines des protéines, au cours d'une réaction irréversible appelée carbonylation. La carbonylation des protéines peut entraîner leur dégradation par le protéasome. Elle peut induire au contraire leur accumulation et entraîner des effets cytotoxiques conduisant à l'inactivation d'enzymes clés du métabolisme, à la désorganisation du cytosquelette d'actine, à l'apoptose ([Nylström 2005](#), [Dasgupta 2013](#), [Fucci 1983](#), [England 2004](#), [Dalle-Donne 2001](#)).

Les ROS modifient de manière post-traductionnelles les résidus cystéines par S-nitrosylation ou glutathionylation (formation de ponts disulfures) ou S-sulfhydrylation. Ces modifications protègent les acides aminés d'une oxydation irréversible, mais modifie la fonction des protéines, perturbe la synthèse d'ARNm, l'organisation et la division cellulaire, jusqu'à entraîner l'apoptose ([Hlaing 2014](#), pour revue [England 2005](#)).

Les protéines oxydées induisent l'expression de protéines chaperonnes (les protéines HSP) afin de protéger les protéines en cours de repliement ([Madamanchi 2001](#), [Essig 1997](#)). Ainsi, l'H₂O₂ induit la translocation nucléaire de HSF1 (Heat Shock transcription Factor-1). Ce facteur, oxydé, a une activité transcriptionnelle augmentée. HSF1 se fixe sur les promoteurs de gènes ayant un motif HSE (Heat Shock Element) et code de nombreuses protéines dont les chaperonnes HSP27 et HSP70 ([Katschinski 2000](#), [Vihervaara 2014](#)). Une augmentation de l'oxydation d'acides aminés, la méthionine ou la tyrosine, a été mis en évidence dans les LBA de patients atteints de FPI ou de SDRA ([Maier 1991](#), [Lamb 1999](#)).

2.4. Lien entre HIF et ROS

Il est intéressant de noter que la stabilisation de HIF- α en réponse à l'hypoxie fait intervenir les ROS mitochondriaux. En effet, l'inactivation par des agents chimiques (terpestacine (inhibiteur du complexe III)) ou génétique (lignée de cellules épithéliales alvéolaires dépourvue d'ADN mitochondrial) de la chaîne mitochondriale empêche la

stabilisation de HIF- α (sauf en anoxie car nécessité d'O₂ pour l'activité des PHD). ([Chandel 1998](#), [Vaux 2001](#), [Schroedl 2002](#), [Jung 2010](#)).

Bien que la régulation de HIF en hypoxie soit liée à une inactivation des PHD par manque d'oxygène, il semblerait ainsi que l'état d'oxydation cellulaire rentre également en jeu. Un autre des cofacteurs des PHD est le Fe⁺⁺. L'accumulation de ROS en hypoxie a pour conséquence l'oxydation du Fe⁺⁺ en Fe⁺⁺⁺ par l'H₂O₂, rendant le site catalytique des PHD inactif ([Gerald 2004](#), pour revue [Wheaton 2011](#)).

En outre, des études in vitro et in vivo ont mis en évidence que l'altération de l'état redox, par des ROS (H₂O₂) ou par des agents alkylants, induisait une diminution de l'expression de HIF-1 α et modulait sa capacité de fixation à l'ADN ([Wang 1995b](#), [Huang 1996](#)).

De manière intéressante, l'équipe de Ratcliffe a montré que le facteur FIH était également inactivé par l'H₂O₂, mais était beaucoup plus sensible à cette ROS que les PHD (Masson 2012). Ainsi, l'hypoxie entrainerait la stabilisation de HIF- α , par inactivation des PHD principalement dû à un manque d'oxygène, et par inactivation du FIH, principalement due à une augmentation d'H₂O₂ intracellulaire.

En retour, HIF pourrait moduler l'accumulation de ROS, en régulant l'expression de gènes clés impliqués dans le métabolisme du glucose afin de limiter la chaîne respiratoire mitochondriale et donc la production de ROS.

En effet, HIF- α induit l'expression :

- Des protéines membranaires GLUT1 et GLUT3, afin de faciliter l'entrée du glucose dans les cellules.
- Des enzymes de la glycolyse qui transforment le glucose en pyruvate
- De la lactate deshydrogénase (LDH) qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate
- De la pyruvate deshydrogénase kinase (PDK1) afin d'empêcher la transformation du pyruvate en Acetyl CoA, ce dernier rentrant dans le cycle de Krebs ([Papandreou 2006](#))

De micro-RNA 210 (miR-210) qui bloque l'assemblage de protéines nécessaires au fonctionnement du complexe I (pour revue [Wheaton 2011](#)).

3. Mort cellulaire et transformations phénotypiques des cellules épithéliales alvéolaires. Influence de l'hypoxie.

L'hypoxie alvéolaire est susceptible de moduler le comportement biologique des pneumocytes. Le bon fonctionnement de nos tissus repose sur un équilibre entre la mort et la prolifération des cellules qui les composent afin d'assurer un renouvellement permanent physiologique. Cependant, lorsque cet équilibre est rompu, des pathologies surviennent. Dans le cadre des pathologies pulmonaires, la FPI semble résulter de microlésions répétées de l'épithélium alvéolaire et d'une perte du dialogue avec les fibroblastes pulmonaires, entraînant une mort massive des pneumocytes II par apoptose ([Uhal 1998](#)). Ainsi, on observe une surexpression de protéines pro-apoptotiques dans les cellules épithéliales alvéolaires de patients atteints de FPI tandis que l'expression de protéines anti-apoptotiques est diminuée, comparativement à des sujets contrôles ([Plataki 2005](#)).

Dans la pathologie du SDRA, la phase inflammatoire, caractérisée par une « explosion cytokinique » provoque également une mort importante des pneumocytes par apoptose. Montrant les effets bénéfiques d'un inhibiteur de caspases dans un modèle murin de SDRA, l'équipe de Hara a mis en évidence le rôle de l'apoptose dans l'apparition de ce syndrome ([Kawasaki 2000](#)). La présence de marqueurs d'apoptose est retrouvée dans le lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de SDRA, contrairement à celui de sujets contrôles. Les taux de certains marqueurs définissent la sévérité du SDRA ([Lee 2008](#)). De plus, l'équipe de Matthay a étudié d'autres marqueurs d'apoptose au niveau des parois alvéolaires de patients morts en situation de SDRA. Ces taux sont retrouvés à des niveaux très élevés comparés à des patients dont le décès est indépendant d'une maladie pulmonaire ([Albertine 2002](#)).

L'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires jouerait donc un rôle déterminant dans la physiopathologie de la FPI et du SDRA.

L'hypoxie alvéolaire, facteur commun à ces deux pathologies pulmonaires, pourrait contribuer à cette apoptose ([Krick 2005](#)). Cependant, le manque d'oxygène déclenche également un programme d'évitement à l'apoptose consistant en des transformations phénotypiques et fonctionnelles, appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

3.1. La mort cellulaire programmée ou apoptose

3.1.1. Définition

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un processus actif permettant à une cellule de déclencher son autodestruction de manière contrôlée, suivant une séquence d'évènements cellulaires bien précis en réponse à divers stimuli. Cette mort cellulaire programmée est physiologique et a lieu de manière très importante lors du développement embryonnaire, notamment pour la « sculpture » des membres ([Kerr 1972](#)). A l'âge adulte, l'homéostasie tissulaire est permise grâce à un équilibre entre apoptose et mitose des cellules. Chaque jour, entre 50 et 70 milliards de cellules sont éliminées par apoptose.

L'apoptose s'oppose à la nécrose, qui est un processus dégénératif passif, non contrôlé et toxique pour l'organisme, en réponse à diverses causes (venin, ischémie, infection...).

3.1.2. Caractéristiques de l'apoptose

L'apoptose est un processus faisant appel à un enchaînement de phénomènes complexes touchant les différents compartiments cellulaires.

Tout d'abord, la chromatine se condense, puis l'ADN est fragmenté entre les nucléosomes, soit tous les 180 paires de bases environ, par des endonucléases, comme la « Caspase-Activated DNase » (CAD) (pour revue [Aleksandrushkina 2012](#)). Des protéases vont dégrader les protéines du cytosquelette. La réorganisation du cytosquelette provoque une condensation de la cellule. Ensuite, le noyau se fragmente, entouré d'une double membrane. Des corps apoptotiques contenant les organelles cytoplasmiques intactes et les fragments nucléaires sont relargués. Ces éléments présentent une redistribution vers leur surface externe des phosphatidyl-sérines (PS) qui vont être reconnus par les cellules immunitaires (pour revue [Wu 2006](#)). Ainsi, ces corps apoptotiques vont être phagocytés, sans avoir de conséquence sur les cellules environnantes.

3.1.3. Rôle des caspases

Divers stimuli intra ou extracellulaires déclenchent l'activation régulée de caspases (cysteine-dependent aspartate-specific protease). Les caspases sont des protéases, exprimées sous forme inactive par la présence d'un « pro-domaine ». Les protéases inactives sont

appelées pro-caspases. Les mécanismes post-traductionnels d'activation des pro-caspases sont multiples. Une première étape est la dimérisation des pro-caspases initiatrices suite à la fixation de protéines adaptatrices au niveau de leur pro-domaine (complexe DISC, apoptosome, inflammasome). Les pro-caspases effectrices sont quant à elles clivées entre leur deux sous-unités les composants). Une seconde étape consiste ensuite à une maturation (clivage du pro-domaine ou entre les deux sous-unités), entraînant l'activation de leur site catalytique (pour revue [Pop 2009](#)). Les caspases activées vont pouvoir cliver les pro-caspases effectrices et initiatrices. Cette boucle d'activation en cascade permet une amplification du signal apoptotique initial.

Une classification divise les caspases selon leur fonction. On distingue les caspases initiatrices (caspases 8, 9, 10) des caspases effectrices (caspases 3, 6, 7). Dans le premier groupe, la caspase 9 transmet des signaux apoptotiques intracellulaires, tandis que les caspases 8 et 10 transduisent des signaux de morts extracellulaires. D'autres caspases interviennent dans différentes signalisations, comme les caspases 1, 4 et 5 dans l'inflammation, la caspase 2 et 12 dans l'activation de l'apoptose en réponse à un stress du réticulum endoplasmique. La caspase 14 est non-apoptotique et intervient dans la différenciation des kératinocytes (pour revue [Pop 2009](#), [Szegezdi 2006](#)).

Les caspases clivent leurs substrats après un résidu aspartate situé dans une poche comportant des acides aminés spécifiques ([Howard 1991](#)). La conformation de ce site conditionne l'affinité de ces substrats pour les caspases. Des études protéomiques in vitro révèlent que ces enzymes clivent environ 400 protéines cellulaires (pour revue [Pop 2009](#)). Sans pouvoir être exhaustif, ces enzymes clivent de manière irréversible de nombreux substrats :

- Les pro-caspases
- Des protéines du cytosquelette
- Des protéines régulant l'apoptose (Smac/DIABLO et HtrA2/Omi inhibiteurs des IAP, les membres de la famille Bcl2) ([Adrain 2001](#), [Van Loo 2002](#)).
- Des enzymes de réparation de l'ADN
- Des inhibiteurs d'endonucléases (comme « l'inhibitor of caspases-activated DNase » (ICAD) libérant ainsi CAD, qui va se transloquer dans le noyau pour fragmenter l'ADN (pour revue [Elmore 2007](#)).
- des kinases induisant notamment l'activation de la voie JNK et à l'inverse inhibant la voie de survie ERK ([Deak 1998](#), [Cardone 1997](#)).

3.1.4. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Lorsque l'intensité du signal apoptotique est faible ou ne dure qu'un court moment, différentes actions ciblant les caspases permettent à la cellule de ne pas rentrer en apoptose. L'action des caspases peut être inhibée, soit par dégradation de ces enzymes par le protéasome, soit en inactivant leur activité. A ce jour, chez l'Homme, 8 IAP ont été identifiés. Chacune d'elles présentent entre une et trois copies du domaine « Baculoviral IAP Repeat » (BIR) formant un motif structural en doigt de zinc et permettant de maintenir à l'état inactif l'IAP (pour revue [Fulda 2012](#)). Excepté la survivine, les IAP possèdent un domaine RING fonctionnant comme une E3 ligase. Les « X-chromosome-linked IAP » (XIAP) et les « cellular IAP » (cIAP) possèdent en plus un domaine « UBiquitin-Associated domain » (UBA). Ce motif permet le recrutement d'ubiquitines, ciblant l'IAP activée liée à une caspase au protéasome. Enfin, les cIAP possèdent un domaine « CAspase-Recruitment Domain » (CARD), permettant d'interagir avec certaines caspases possédant ce motif [Figure 20].

Seule la XIAP est identifiée comme interagissant directement avec les caspases 3, 7 par ses domaines BIR1 et BIR2, et avec 9 grâce à son motif BIR3 (pour revue [Fulda 2012](#)). Les autres IAP ne semblent pas impliquées directement dans l'inhibition des caspases (Eckelman 2006). Cependant, ces enzymes inhiberaient l'activité des inhibiteurs d'IAP comme Smac, et inhiberaient le clivage de la caspase 8 (pour revue [Fulda 2012](#)).

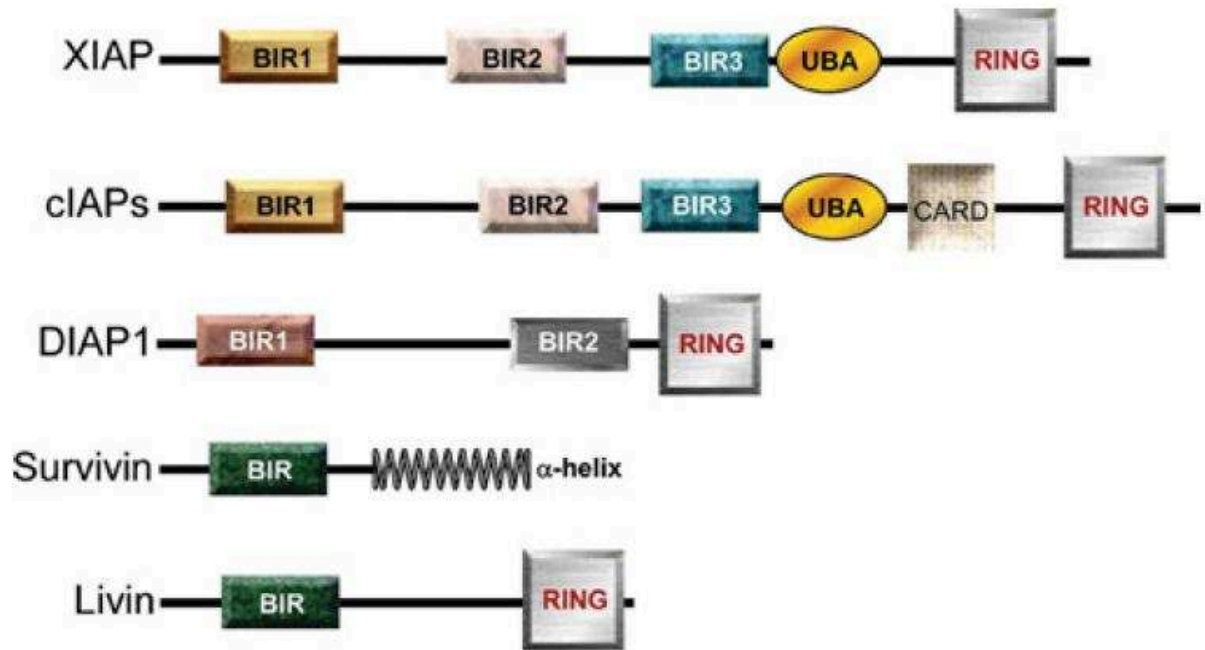


Fig 20. Représentation de la structure des différentes IAP. BIR = baculoviral IAP repeat, UBA = ubiquitin-associated domain, RING = Really Interesting New Gene. CARD = Caspase-Recruitment Domain (pour revue [Altieri 2010](#)).

Dans les cellules de mammifères deux voies de signalisation ont été bien caractérisées : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est déclenchée à l'extérieur de la cellule lorsque les conditions extracellulaires dictent que la cellule doit mourir. A l'inverse, la voie intrinsèque se déclenche lorsqu'un dommage se produit à l'intérieur de la cellule.

3.1.5. La voie intrinsèque

L'initiation du programme de mort cellulaire peut se produire à partir de l'intérieur de la cellule, en réponse à un stress tel que l'hypoxie, une carence en facteurs de survie, ou encore un dommage à l'ADN. La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale. En effet, cette voie repose sur la formation de pores dans la membrane externe des mitochondries conduisant à libération dans le cytosol de facteurs mitochondriaux localisés normalement dans l'espace inter-membranaire qui vont alors activer une cascade de caspases. Le principal facteur mitochondrial libéré est le cytochrome c. Le cytochrome c, ainsi libéré dans le cytosol, forme un complexe multimérique en se liant à la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), et à la pro-caspase initiatrice 9. Le complexe ainsi formé porte le nom

d'apoptosome. Il permet le clivage et donc l'activation de la pro-caspase 9 [Figure 21] ([Kim 2005](#)). L'activation de cette caspase 9 initiatrice (à l'instar de la caspase 2, 8 et 10) conduit à son tour au clivage et ainsi à l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7.

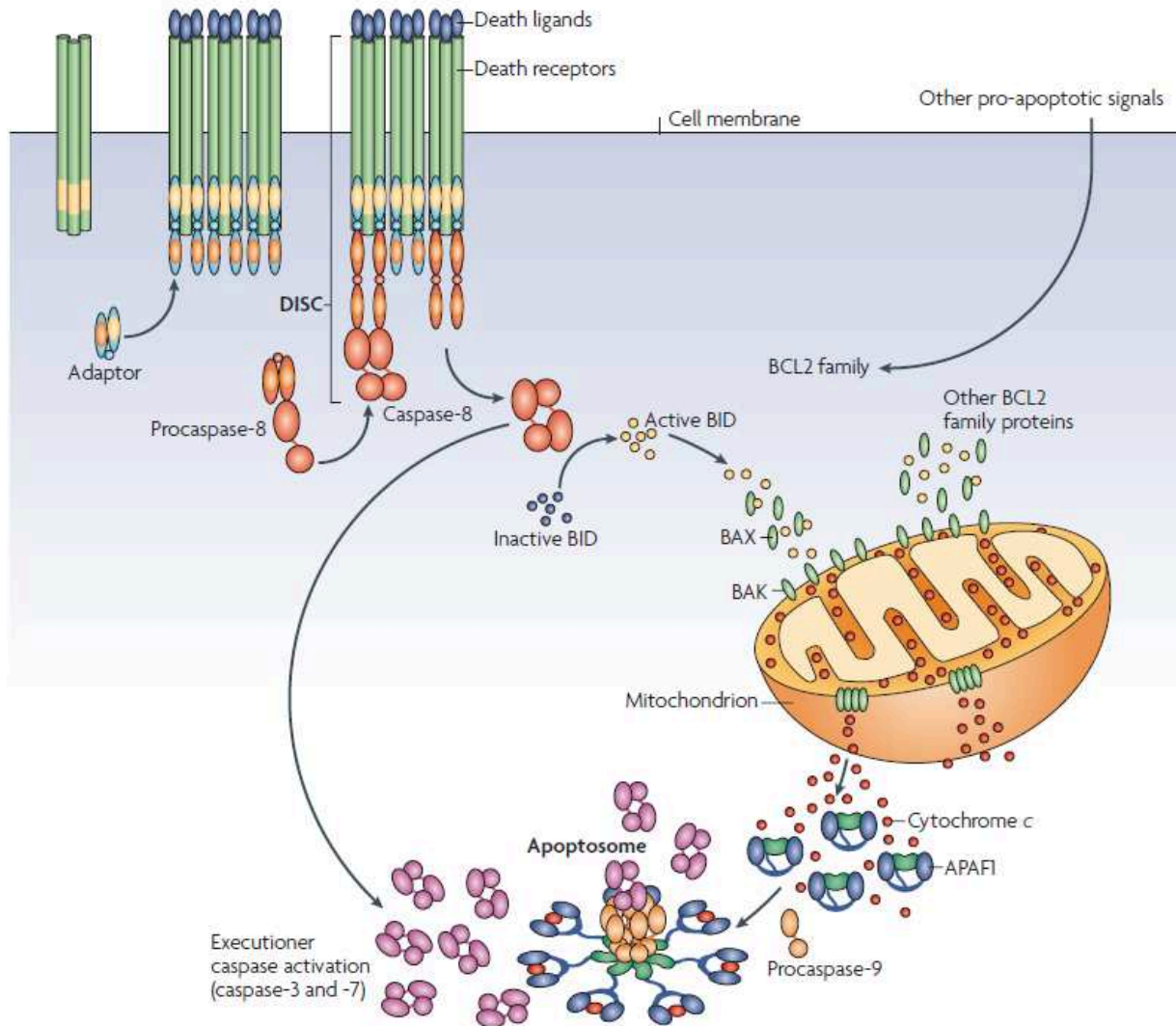


Fig 21. Schéma représentant le déclenchement de l'apoptose, par la voie intrinsèque ou extrinsèque (pour revue [Ow 2008](#)).

D'autre part, la perméabilisation de la membrane mitochondriale a des répercussions physico-chimiques. En effet, la respiration mitochondriale s'arrête, du fait de la dissipation du gradient électrochimique de protons (effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$) ([Bernardi 1992](#)) et du relargage du cytochrome c (indispensable à la respiration mitochondriale) dans le cytosol.

La libération des facteurs mitochondriaux est contrôlée par une grande famille de protéines appelée la famille Bcl-2. Les membres de cette famille contiennent des régions d'homologie de séquence appelées Bcl-2 Homology (BH). On distingue trois sous-familles qui diffèrent par le nombre de domaines BH et par leur capacité à stimuler (pro-) ou à inhiber l'apoptose (anti-). La balance entre ces différents membres de la famille Bcl-2 permet d'orienter le devenir de la cellule, entre survie et apoptose.

3.1.5.1. Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

On peut distinguer les modulateurs et les effecteurs de l'apoptose.

La première sous-famille représente les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok, constituées de plusieurs domaines BH (BH1 à BH3) et d'un domaine transmembranaire [Figure 21]. En réponse à un stimulus apoptotique, ces protéines se lient à la membrane externe des mitochondries, et permettent la formation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) ([Borner 2003](#)). La perméabilisation de la membrane mitochondriale provoque la libération des facteurs mitochondriaux tels que le cytochrome c.

On distingue la sous-famille « BH3-only » qui regroupe les protéines ne possédant qu'un seul domaine BH, le domaine BH3 [Figure 22]. Ces facteurs vont promouvoir l'apoptose en se transloquant au niveau de la membrane externe mitochondriale suite à un signal d'activation. Ils induisent l'activation des protéines Bax, Bak ou Bok, leur insertion à la membrane externe mitochondriale et leur oligomérisation conduisant à la formation des mPTP ([Vela 2013](#)). Ces facteurs BH3-only agissent donc comme messagers en transmettant les signaux apoptotiques cytoplasmiques à la mitochondrie. Les membres de la famille BH3-only se lient également aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et les inhibent. ([Ray 2000](#), pour revue [Lomonosova 2008](#)).

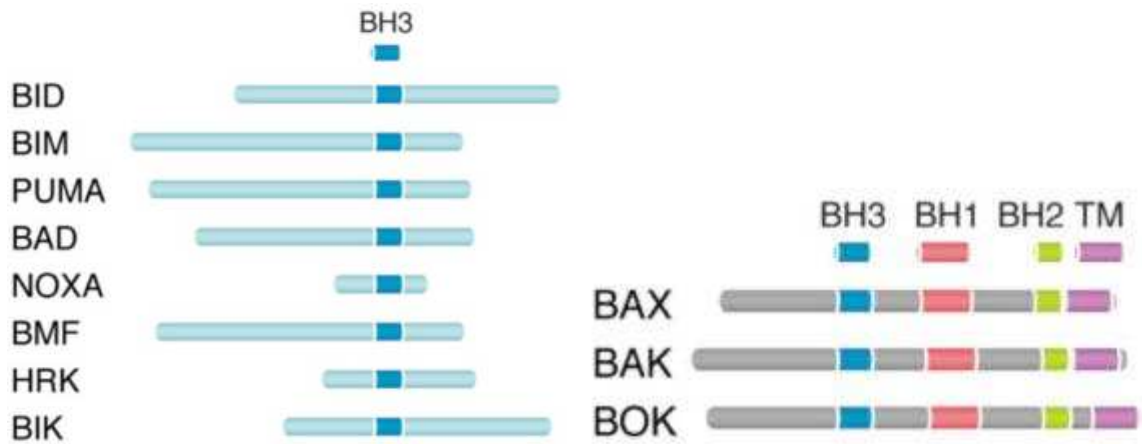


Fig 22. Représentation de la structure des différents membres pro-apoptotiques mitochondriaux de la famille Bcl-2. BH = Bcl2-Homology. TM = Domaine Trans-Membranaire. A gauche, les membres BH3-only modulateurs de l'apoptose. A droite, les membres pro-apoptotiques effecteurs (D'après Gavathiotis, Structural perspectives on Bcl-2 family of proteins, pp229-251, Springer).

Dans la famille BH3-only on distingue Bnip3 (Nip3) et Bnip3L (ou Nix). Ces facteurs possèdent un domaine transmembranaire très similaire qui leur permet de se localiser au niveau de la membrane externe mitochondriale suite à un stress, notamment un stress oxydant ([Kubli 2008](#)). La partie C-terminale du domaine TM permet à ces protéines de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak) ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl), induisant ainsi de manière directe ou indirecte l'ouverture des mPTP ([Boyd 1994](#), [Chen 1999](#), [Ray 2000](#), [Kubli 2007](#), [Kim 2002](#), pour revue [Chinnadurai 2008](#)). Par ailleurs, les ROS ont été montrés comme jouant un rôle essentiel dans l'insertion de Bnip3 à la mitochondrie et dans l'induction de l'apoptose ([Zhang 2007](#), [Kim 2011](#)). En effet, les travaux de l'équipe de Gustafsson indiquent que les ROS facilitent la formation de ponts disulfures, et ainsi la dimérisation de Bnip3 ([Lee 2015](#)). La diminution des ROS par l'emploi de N-acétyl-cystéine (NAC) prévient la dimérisation et l'apoptose ([Kubli 2008](#)). De même l'emploi de mutants Bnip3 incapables de se dimériser permet également d'inhiber l'apoptose ([Kubli 2008](#)).

3.1.5.2. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les membres anti-apoptotiques de cette sous-famille possèdent trois ou quatre domaines BH (BH1, à BH4) et un domaine transmembranaire (TM) [Figure 23]. Ces facteurs vont se lier aux membres pro-apoptotiques (Bax, Bak...). Ainsi, les facteurs pro-apoptotiques contenus dans la mitochondrie (comme le cytochrome c, Omi, Smac/Diablo...) ne sont pas libérés dans le cytoplasme.

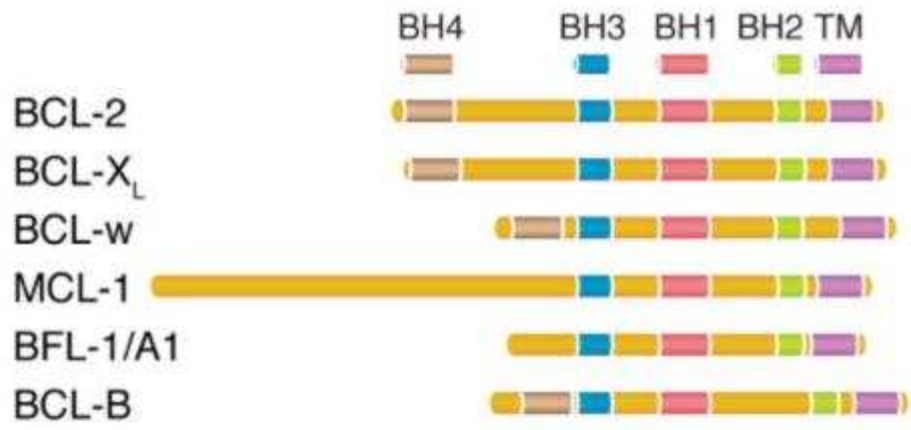


Fig 23. Représentation de la structure des différents membres anti-apoptotiques mitochondriaux de la famille Bcl-2. BH = Bcl2-Homology. TM = Domaine Trans-Membranaire (D'après Gavathiotis, *Structural perspectives on Bcl-2 family of proteins*, pp229-251, Springer).

3.1.6. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est activée au niveau de récepteurs exprimés à la surface de la cellule, appelés récepteurs de mort. Différents ligands ont la possibilité de déclencher la voie extrinsèque en se fixant sur leurs récepteurs de mort. Parmi les couples ligand/récepteur, on retrouve selon le type cellulaire, le TNF- α , β /TNFR, le TNF- β /TNFR, Fas/FasL, TRAIL/DR4-DR5-DcR1,2 (Decoy receptors), TWEAK/TWEAKR2-FN14) ou encore VEG1/DR3-DcR3 (pour revue [Shakibaei 2005](#)).

3.1.6.1. Mécanisme

La liaison du ligand à son récepteur entraîne la trimérisation du récepteur et le recrutement de protéines adaptatrices (FADD, TRADD) et de la pro-caspase initiatrice 8. Le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) ainsi formé [Figure 20], permet le clivage et

l'auto-activation de la pro-caspase 8 qui va à son tour cliver et activer les pro-caspases effectrices 3, 6, et 7, et également cliver Bid (facteur BH3-only) qui jouera son rôle pro-apoptotique au niveau de la mitochondrie.

3.1.6.2. Fas, Fas-L dans la FPI et le SDRA

Lors de la dernière phase du processus de réparation épithéliale physiologique, les pneumocytes de type II hyperplasiques se transdifférencient en PI, ou entrent en apoptose ([Fine 1997](#), [Fehrenbach 1999](#)). Cette apoptose est médiée par le récepteur Fas, exprimé à la surface des cellules épithéliales alvéolaires (pour revue [Galani 2010](#), [Matute-Bello 2001](#), [Han 2012](#), [Ma 2010a](#)).

Cette voie Fas est impliquée dans la FPI et le SDRA. Ainsi, le récepteur Fas est surexprimé dans les CEA de patients atteints de FPI ([Kuwano 1999](#)). Par ailleurs, le défaut de sécrétion de prostaglandine E2 par les CEA de patients atteints de FPI entraîne une augmentation de leur apoptose via l'activation de Fas ([Maher 2010](#)). De même des concentrations très élevées de Fas et FasL sont retrouvées dans l'œdème pulmonaire des patients atteints de SDRA ([Albertine 2002](#)).

3.1.7. Rôle potentiel de l'hypoxie

Dans différents types cellulaires, une implication des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α dans la mort cellulaire a été mise en évidence via des mécanismes différents :

➤ HIF-1 est capable d'induire la transcription de facteurs pro-apoptotiques tels que les protéines BH3-only Bnip3 ([Bruick 2000](#), [Guo 2001](#), [Sowter 2001](#), [Vande Velde 2000](#)), Bnip3L ([Sowter 2001](#), [Krick 2005](#)), Noxa ([Kim 2004](#)), qui, en se liant aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-xl facilitent l'hétérodimérisation de Bax avec Bak ([Boyd 1994](#), pour revue [Lomonosova 2008](#)). D'autre part, HIF-1 α , peut induire la stabilisation de p53 ([Carmeliet 1998](#), [Chen 2003](#)), qui induit l'expression de cibles pro-apoptotiques (Noxa, Puma, Perp, Fas, Apaf-1, Bax, Bid...), et réprime l'expression de Bcl-2 ([Schuler 2001](#), [Green 2009](#), pour revue [Grejfer 2004](#)). Une autre cible de HIF-1 récemment découverte, la GTPase Rab20, a également été montrée comme étant pro-apoptotique. Son rôle n'est pas encore bien défini, mais elle pourrait intervenir dans le transport des protéines pro-apoptotiques à la membrane mitochondriale ([Hackenbeck 2011](#)). Enfin, le TGF- β , molécule pro-fibrosante induite en

hypoxie, participe à l'apoptose induite par Fas-L dans les cellules bronchiolaires et alvéolaires ([Hagimoto 2002](#)).

➤ HIF-2, stabilisé en réponse à une irradiation aux UV, induit l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que la caspase 7 et TRAIL et TRAIL receptor (DR5) (et par la suite la cascade d'activation qui met en jeu l'activité JNK et p38 pour induire l'apoptose) ([Turchi 2008](#), [Mahajan 2008](#)). L'expression de TRAIL et DR5 est retrouvée, à l'instar de p53, dans les cellules épithéliales alvéolaires de patients atteints de FPI ([Akram 2014](#)).

A l'inverse, HIF2- α pourrait exercer un rôle dans la survie cellulaire. En effet, ce facteur inhibe l'expression de Bnip3 dans des cellules rénales ou hépatiques issues de carcinomes ([Raval 2005](#), [Menrad 2010](#)).

Des taux élevés d'espèces réactives à l'oxygène sont retrouvés chez les patients atteints de pneumopathies interstitielles diffuses, ainsi que dans des modèles animaux ([Kuwano 2003](#), pour revue [Kinnula 2008](#)). En effet, l'hypoxie induit une accumulation de ROS dans les CEA ([Dada 2003](#), [Zhou 2009](#)). Ces radicaux libres vont réagir avec les composants cellulaires et induire des dommages tels que l'oxydation de l'ADN, la carbonylation des protéines ou la peroxydation des lipides, qui sont autant de signaux susceptibles d'activer la voie intrinsèque. Par ailleurs, au niveau mitochondrial, les ROS facilitent l'ouverture du mPTP, la libération du cytochrome c et l'activation des caspases effectrices 3 et 7. En revanche, les ROS ne semblent pas induire la voie extrinsèque, la pro-caspase 8 restant inactive ([Dumont 1999](#)).

3.2. La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)

3.2.1. Caractéristiques

Les cellules épithéliales se caractérisent par leur capacité à former un épithélium jointif grâce aux nombreuses jonctions qu'elles forment entre elles (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes), permettant la mise en place d'une polarité apico-basale. Elles reposent sur une membrane basale sur laquelle elles peuvent se déplacer mais de laquelle elles ne peuvent normalement pas se détacher.

Les cellules mésenchymateuses, au contraire, n'ont pas de polarité apico-basale, ne forment pas de jonctions serrées avec les cellules environnantes, et ne s'ancrent pas sur une lame basale. Ces caractéristiques leur permettent de migrer facilement, en répétant des phases d'extension, d'adhésion, de rétraction et de translocation.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus dynamique réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales, pour acquérir des propriétés mésenchymateuses [Figure 24]. Ce processus inclut une perte des contacts intercellulaires, une perte de la polarité apico-basale, un réarrangement du cytosquelette d'actine, un gain de mobilité mais également une résistance à l'apoptose ([Vega 2004](#), pour revue [Kalluri 2009](#)).

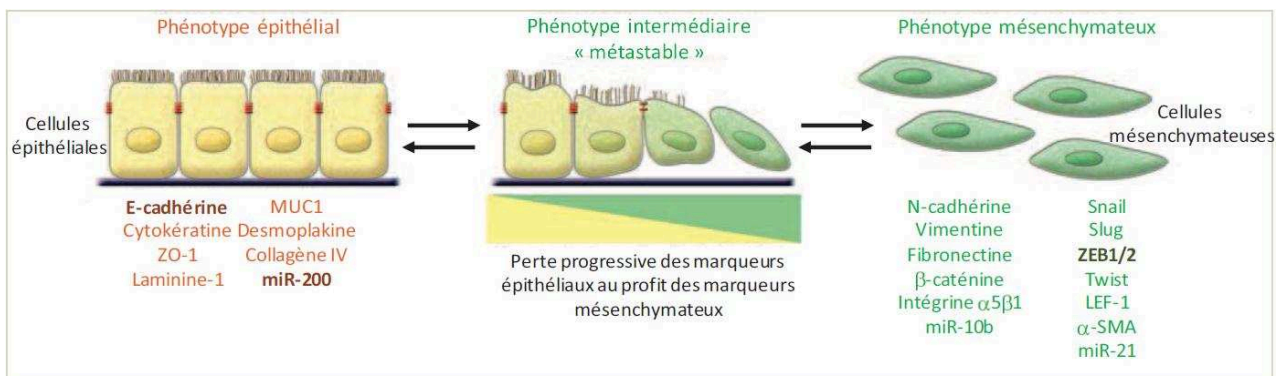


Fig 24. Schéma représentant la transition épithélio-mésenchymateuse. Les cellules épithéliales adhérentes, possédant de nombreux marqueurs caractéristiques de leur *phénotype*, les perdent progressivement au cours de la TEM, pour en acquérir d'autres, caractéristiques des cellules mésenchymateuses (Adapté de [Kalluri 2009](#)).

3.2.2. Les types de TEM

On distingue différents types de TEM [Figure 24]. La TEM de type 1 caractérise les phénomènes physiologiques de morphogenèse, d'embryogenèse (implantation, gastrulation...), à la formation des tissus. La TEM intervient notamment dans la migration de cellules épithéliales au niveau des crêtes neurales [Figure 25, à gauche]. Elle met en jeu des voies de signalisations activées par les facteurs de transcription dont les membres de la famille Wnt, BMPs, FGF (pour revue [Zeisberg 2009](#)). L'expression de molécules d'adhérence, comme la N-cadhérine et la E-cadhérine, est inhibée, permettant ainsi aux cellules mésenchymateuses « primitives » de migrer au niveau des crêtes, et de reformer ensuite par le phénomène inverse, (la TME ou transition mésenchymo-épithéliale) un nouvel épithélium « secondaire » (pour revue [Kalluri 2009](#)).

La TEM de type 2 est associée à un contexte de réparation après lésion [Figure 25, au milieu]. Ainsi, au cours du processus de cicatrisation de la peau, la ré-épithélialisation épidermique passe par une mobilisation des kératinocytes, subissant une TEM afin de s'activer et de migrer au site lésionnel (pour revue [Kalluri 2009](#)). Cependant, lorsque cette TEM n'est pas régulée correctement, elle peut conduire au développement de la fibrose. En effet, certains signaux inflammatoires favorisent la TEM des cellules épithéliales. Ainsi dans un modèle murin de fibrose rénale, il apparaît qu'une partie des fibroblastes provient de cellules épithéliales ayant subi un phénomène de TEM ([Iwano 2002](#)). De même, une étude sur la fibrose hépatique indique que près de 45% des fibroblastes dériveraient d'hépatocytes ayant subi une TEM ([Zeisberg 2007](#)).

La contribution de la TEM à la fibrogenèse pulmonaire est controversée. D'un côté, différentes études de traçage des CEA ont mis en évidence la contribution des CEA dans la fibrogenèse pulmonaire chez la souris par TEM ([Kim 2006a](#), [Kim 2009a](#), [Tanjore 2009](#), [DeMaio 2012](#), [Degryse 2010](#), [Degryse 2011](#)). Chez l'Homme, l'étude de biopsies de poumons provenant de patients atteints de FPI révèle une co-localisation des marqueurs épithéliaux (SP-B, SP-C, TTF-1) et mésenchymateux (comme la N-cadhérine, l' α -SMA, la vimentine) ([Kim 2006a](#), [Willis 2005](#), [Harada 2010](#)). D'un autre côté, certaines études remettent en cause l'impact de la TEM dans la fibrogenèse. Ainsi, les premières études sur la TEM dans la fibrogenèse rénale et hépatique ont été remises en question ([Humphreys 2010](#), [Taura 2010](#)). Les traçages cellulaires montrent le recrutement et la différenciation de cellules périvasculaires (les péricytes) en myofibroblastes, mettant en défaut la TEM des cellules

épithéliales dans ces organes. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, une étude récente de traçage est en contradiction avec les études précédentes ([Rock 2011](#)). Utilisant des techniques d'analyses différentes, Rock et son équipe montrent qu'en condition bléomycine, les CEA n'expriment pas de marqueurs mésenchymateux (α -SMA, vimentine), à l'instar d'autres cellules épithéliales bronchiolaires et de péricytes.

La TEM de type 3, est quant à elle impliquée dans la formation de métastases [Figure 25, à droite]. La prolifération dérégulée des cellules épithéliales, associée à une angiogenèse anormale, sont les conditions permettant la dissémination des cellules tumorales vers d'autres tissus. La TEM est connue pour être impliquée dans la progression de différents cancers en participant à l'apparition de métastases (pour revue [Thiery 2002](#)). L'augmentation des marqueurs de TEM est corrélée à un pronostic sombre chez des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire ([Shi 2013](#)).

Il est à noter que le phénomène de TEM est réversible. Les cellules tumorales circulantes, vont pouvoir coloniser d'autres tissus en effectuant le processus inverse, appelé MET (Transition Mésenchymo-Epithéliale), reformant ainsi ailleurs dans l'organisme un carcinome (pour revue [Kalluri 2009](#)).

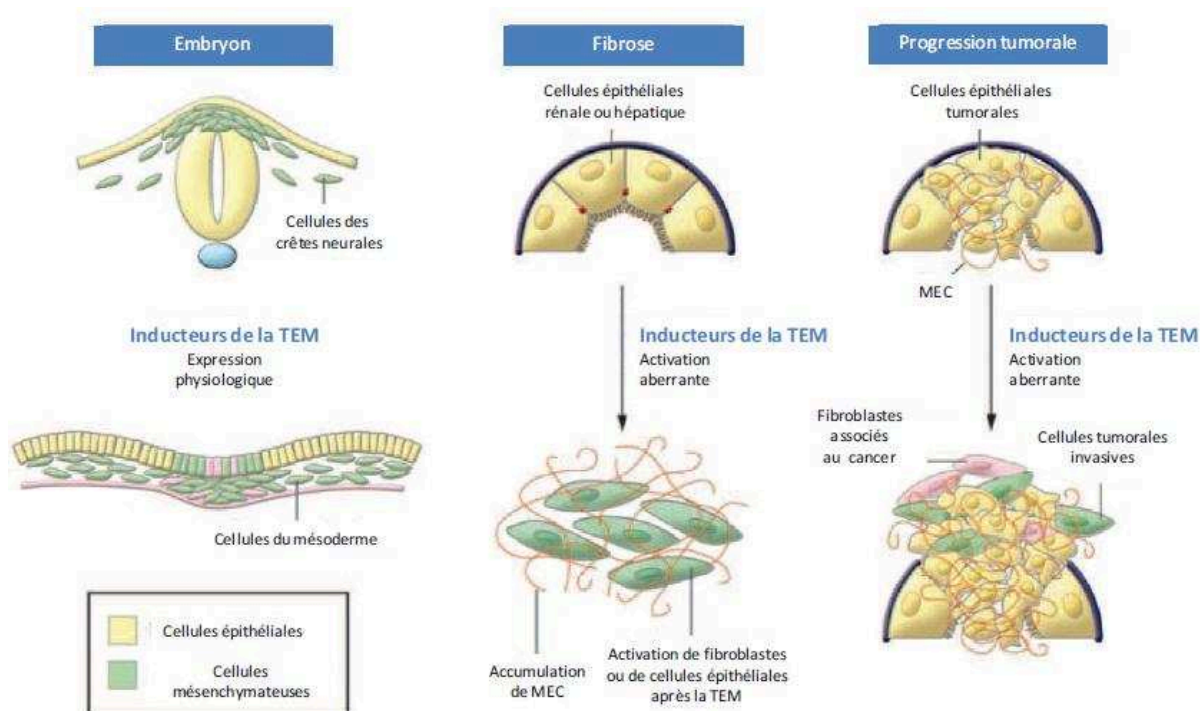


Fig 25. Schéma représentant les différents types de TEM. A gauche : TEM de type 1 lors de l'embryogenèse physiologique. Au milieu : TEM de type 2, déclenchant ici une fibrose suite à la transition subit de manière dérégulée par les cellules épithéliales. A droite la TEM de type 3, menant à la progression tumorale (D'après [Acloque 2009](#)).

3.2.3. Les mécanismes de la TEM

3.2.3.1. Inducteurs de la TEM

La TEM peut être déclenchée par de nombreux facteurs notamment le TGF- β , les FGF (dont le HGF), le TNF- α , les molécules Wnt, mais aussi l'hypoxie ou les ROS [Figure 26]. Les voies de signalisations déclenchées par ces facteurs convergent vers l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui stimule l'expression de facteurs de transcription induisant l'EMT : Snail, Twist, et Zeb.

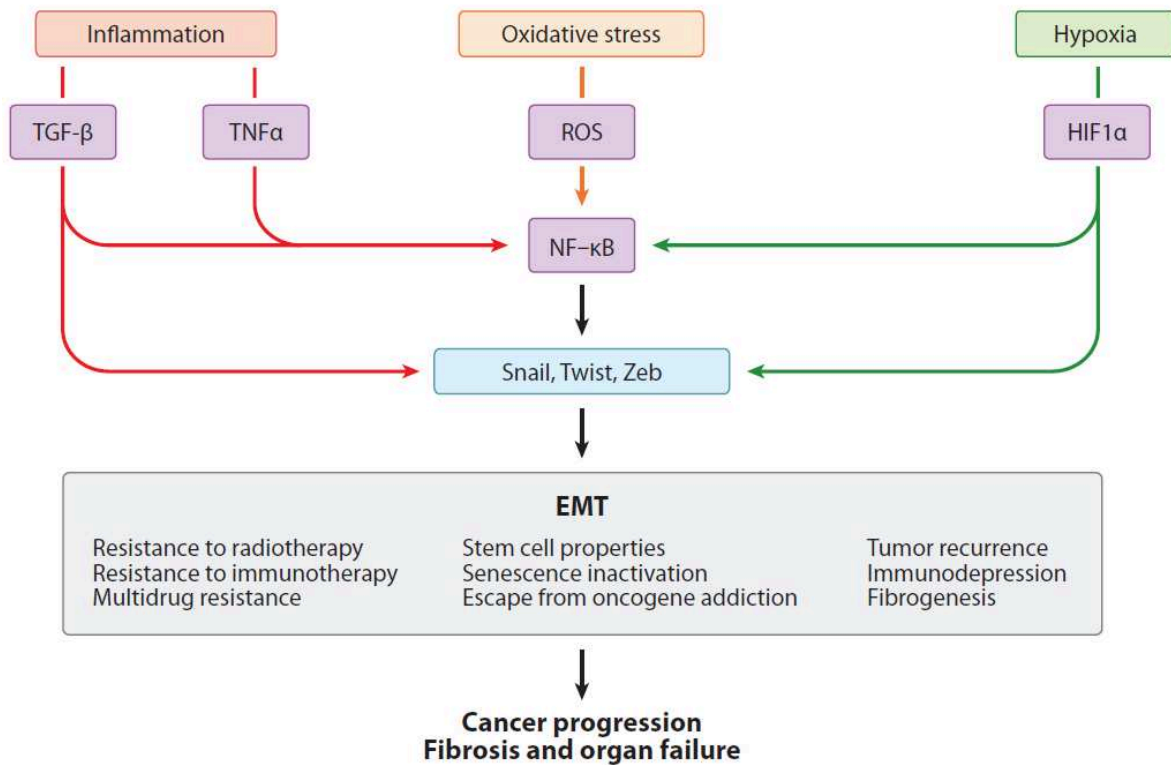


Fig 26. Schéma des principales voies conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions impliqués dans la TEM. (Nieto 2011).

Parmi ces facteurs, le TGF-β est considéré comme le facteur clé induisant la TEM. Son expression est ubiquitaire. On distingue 3 isoformes du TGF-β (TGF-β-1, 2 et 3), codées par 2 gènes. Ces différentes isoformes sont impliquées dans l'embryogenèse, mais aussi dans la réparation tissulaire, l'immunité et la tumorigenèse. Le TGF-β1 est considéré comme le facteur clé induisant la TEM dans différents types de cellules épithéliales, participant à de nombreuses fibroses, dont les fibroses rénale et hépatique (pour revue [Border 1994](#)).

Le TGF-β1 est également impliqué dans l'initiation et le développement de la fibrose pulmonaire ([Anscher 1993](#), [Coker 1997](#), [Coker 2001](#), [Zhao 2002](#), [Bonniaud 2005b](#)). Son rôle est multiple. Le TGF-β induit l'apoptose des CEA, la TEM et la migration des CEA, la synthèse de collagène, la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ([Zhang 1994](#), [Hagimoto 2002](#), [Kasai 2005](#), [Willis 2005](#), [Kim 2006a](#), [Yu 2008](#)). Les myofibroblastes, sécrètent de grandes quantités de TGF-β qui les protègent de l'apoptose induite par IL-1β, cytokine sécrétée par les macrophages et les monocytes et contribuant à la régulation de la prolifération des fibroblastes ([Zhang 1995](#), [Zhang 1999](#)). Cette résistance à l'apoptose passe notamment par le maintien de l'expression de Bcl-2 ([Zhang 1999](#)).

La majorité du TGF- β est présent dans le milieu extracellulaire sous une forme latente, inactive, associée aux protéines LAP (Latency-Associated Peptide) et LTBP (Latent TGF Binding Protein). Le TGF- β devient actif par protéolyse, et est stabilisé par les intégrines membranaires comme $\alpha_v\beta_6$ exprimées par les cellules épithéliales ([Munger 1999](#), [Kim 2006a](#)).

Le TGF- β est susceptible d'induire la génération de ROS en induisant une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase Nox4 dans les cellules endothéliales ([Hu 2005](#)). Cette enzyme est impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire dans un modèle murin de fibrose à la bléomycine, et induit également des ROS dans les CEA en réponse au TGF- β in vitro ([Carnesecchi 2011](#), [Felton 2009](#)). D'autre part, le TGF- β inhibe la γ -glutamylcysteine

synthase, enzyme permettant la synthèse de glutathion ([Arsalane 1997](#)). Par voie de conséquence, le pool de GSH est réduit en présence de TGF- β , facilitant l'accumulation des ROS ([Felton 2009](#)). La génération de ROS en elle-même semble cependant insuffisante pour induire la TEM dans les CEA ([Felton 2009](#)). L' H_2O_2 n'a in vitro pas d'effet sur le phénotype épithélial des CEA. En revanche, l'augmentation des ROS intracellulaires provoquée par le TGF- β induit la phosphorylation de Smad3, qui participe à la signalisation aboutissant à la TEM ([Felton 2009](#)). Pour Zhou et son équipe, les ROS induits par l'hypoxie permettent d'activer le TGF- β se trouvant sous forme latente dans le milieu extracellulaire ([Zhou 2009](#)).

3.2.3.2. Répresseurs de la TEM

De façon contradictoire, le HGF a également été montré comme répresseur de la TEM dans un modèle de fibrose rénale chronique. Dans ce contexte, le HGF induit SnoN, un répresseur des Smad (intervenant dans la signalisation du TGF- β), et inhibe l'expression du TGF- β par les cellules épithéliales (voir point suivant) ([Mizuno 1998](#), [Yang 2005](#)). Le HGF montre également des propriétés anti-TEM et anti-fibrosantes dans des modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire, hépatique, cardiaque ou cutanée (pour revue [Crestani 2012](#)).

Les facteurs BMP (Bone Morphogenic Proteins) semblent également inhiber la TEM. Ces protéines de la famille des TGF- β , interviennent dans de nombreux mécanismes au cours du développement embryonnaire (pour revue [Wang 2014](#)) et participent à l'âge adulte, à l'homéostasie tissulaire dans tout l'organisme (système pulmonaire, cardiovasculaire, neurologique...) (pour revue [Wang 2014](#)). Les BMP agissent comme antagonistes de la voie des Smad activée par le TGF- β (voir point suivant). L'expression des BMP pourrait protéger

contre la fibrose rénale, en inhibant l'effet du TGF- β ([Zeisberg 2003](#)). Ainsi, BMP-7 inhibe la TEM via l'induction de l'expression d'Id2, facteur réprimant l'activité transcriptionnelle de TWIST, ainsi que l'expression du marqueur mésenchymateux α -SMA (l'actine du muscle lisse α) ([Yang 2015a](#), [Izumi 2006](#)). De manière intéressante, on retrouve des taux de BMP-7 inférieurs à la normale chez des patients atteints de FPI ([Gu 2014](#)). De plus, les BMP induisent le processus inverse, la TME ou transition mésenchymo-épithéliale ([Zeisberg 2003](#), [Valcourt 2005](#), [Zeisberg 2005](#)).

La N-acétyl-cystéine est le précurseur du glutathion, un puissant antioxydant. La NAC permet la restauration d'un pool intracellulaire de glutathion réduit (GSH), qui est diminué lors de stress oxydatif ([Grinberg 2005](#), [Felton 2009](#)). La NAC semble inhiber la cascade de signalisation induite par le TGF- β en agissant en particulier sur la phosphorylation de Smad3 ([Felton 2009](#)).

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) est un gaz intervenant dans la formation des alvéoles, le développement pulmonaire, et dans bien d'autres fonctions (relaxation musculaire, neurotransmetteur, dilatation vasculaire) (pour revue [Kubes 1995](#)). Il s'agit d'un messager chimique paracrine. Le NO est synthétisé à partir de L-arginine par une enzyme, la « NO synthase » (NOS), exprimée sous 3 formes : la forme neuronale nNOS, la forme endothéliale eNOS, et une forme inductible iNOS. Dans un modèle de fibrose à la bléomycine, le NO prévient le développement de la fibrose, en induisant l'apoptose des myofibroblastes ([Chung 2003](#), [Zhang 1999](#)). D'autre part, in vitro, le NO prévient la TEM des CEA ([Vyas 2007](#)). L'étude montre que le TGF- β inhibe fortement l'expression et l'activité d'eNOS, responsable à 67% de la synthèse de NO dans les CEA. L'instillation exogène de NO permet de prévenir la perte du phénotype épithélial des CEA en présence de TGF- β .

3.2.3.3. Voies de signalisation

3.2.3.3.1. Transduction du signal

Parmi les différentes voies de signalisation engagées dans les processus de TEM à l'âge adulte, le TGF- β constitue la voie dominante. Lorsque le TGF- β se fixe à son récepteur transmembranaire serine/thréonine kinase de type II, celui-ci est phosphorylé et s'oligomérisé avec le récepteur de type I pour former un tétramère. La transduction du signal passe par la phosphorylation des R-Smad (Receptor-activated Smad 2 et 3), conduisant à leur association avec Smad4, une « Co-Smad » (Common-partner Smad). Ce complexe multimérique (R-

Smad/Co-Smad/Smad4) est ensuite transloqué dans le noyau ([Bonniaud 2004](#), pour revue [Eickelberg 2001](#)). A noter l'existence de facteurs inhibiteurs de la transduction du signal, comme les Smad inhibitrices (les I-Smad). Ainsi Smad 6 se fixe à Smad 4 et inhibe son activité, tandis que la Smad 7 se fixe au récepteur de type I et induit la dégradation du multimère par le protéasome et les lysosomes après ubiquitination par Smurf2 ([Kavsak 2000](#)).

Les éléments de réponse au TGF- β comprennent non seulement la cascade des Smad, mais également les voies PI3K–AKT, ERK MAPK, p38 MAPK et JNK (pour revue Lamouille 2014).

Le complexe des Smad dans le noyau va alors activer la transcription de gènes cibles, dont les facteurs de transcription SNAI et des protéines pro-fibrosantes comme le CTGF, l' α -SMA, le collagène de type I, la fibronectine et le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor -1).

Par ailleurs, des gènes codant des miRNA sont modulés par le TGF- β . Ces ARN non codants se lient de manière spécifique à certains ARNm de manière spécifique, inhibant leur traduction ou entraînant leur dégradation. Certains sont impliqués dans la dégradation de facteurs de transcription pro-TEM (comme SNAI1 et ZEB par les miR-29 ou ceux de la famille des miR-200) ([Ru 2012](#)). Lors de l'induction de la TEM, ces miRNA sont réprimés afin de faciliter la progression de la TEM ([Liu 2013](#), [Bracken 2008](#)). D'autres miR sont impliqués dans l'induction du phénotype mésenchymateux, induisant la rupture des jonctions cellulaires et le remodelage du cytosquelette (formation de lamellipode, filopodes, réorganisation du réseau d'actine) ([Ma 2010b](#), [Papadimitriou 2012](#)).

3.2.3.3.2. Les facteurs de transcription de la TEM

Les différentes voies de signalisations ayant pour fonction d'induire la TEM aboutissent à l'expression d'une vingtaine de facteurs de transcription, dont les principaux sont détaillés ci-dessous :

- Les facteurs de transcription de la famille SNAI : SNAI1 (SNAIL) et SNAI2 (ou SLUG). Ces protéines présentent des motifs en doigt de zinc. Les membres SNAI induisent la TEM dès l'embryogenèse lors de la mise en place du mésoderme et des crêtes neurales, mais également dans l'organogenèse (pour revue [Nieto 2002](#)) en stimulant ou en réprimant l'expression de nombreuses cibles [Figure 26]. Ainsi, les SNAI répriment l'expression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine ou la desmoplakine, intervenant dans la formation des jonctions cellulaires ([Cano 2000](#)). Les SNAI répriment également la transcription de Crumbs3 et Lgl2, impliqués dans la

polarité cellulaire ([Aigner 2007](#), [Spaderna 2008](#)). D'un autre côté, les SNAI activent l'expression de gènes codant des marqueurs mésenchymateux, tel que la fibronectine ou la vimentine ([Cano 2000](#)). De plus, SNAIL induit l'expression de SLUG, TWIST1 et ZEB1 et ZEB2 (pour revue [Heldin 2012](#)).

- TWIST1 est un facteur de transcription à motif bHLH. TWIST1 réprime l'expression des marqueurs épithéliaux au profit de l'expression de marqueurs mésenchymateux, dont certains sont aussi des cibles de SNAIL [Figure 27]. De plus, TWIST1 induit l'expression de SNAIL ([Smit 2009](#)). Ainsi ces deux facteurs s'induisent mutuellement. L'activation de TWIST1 est également possible grâce à Smad3 qui réprime l'expression de l'inhibiteur de TWIST1 Id1 (Inhibitor of Differentiation) dans des cellules épithéliales bronchiolaires ([Kang 2003](#)). De manière intéressante, TWIST1 est exprimé dans les foci fibroblastiques de patients atteints de FPI, cependant, le marquage de TWIST1 dans les CEA est sujet à discussion ([Pozharskaya 2009](#), [Lomas 2012](#)).
- Les facteurs de transcription à doigts de zinc, ZEB1 et ZEB2. Ils possèdent un domaine SID (Smad Interacting Domain), permettant d'interagir avec les R-Smad dans les voies de signalisations TGF- β et BMP. De nombreuses séquences, dont le SID, diffèrent entre les deux membres (pour revue [Sanchez-Tillo 2011](#)). Leurs rôles peuvent ainsi être opposés, cependant ces 2 facteurs de transcription répriment l'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, ZO-1...) et induisent l'expression de marqueurs mésenchymateux [Figure 27] ([Postigo 2003](#), [Comijn 2001](#)).

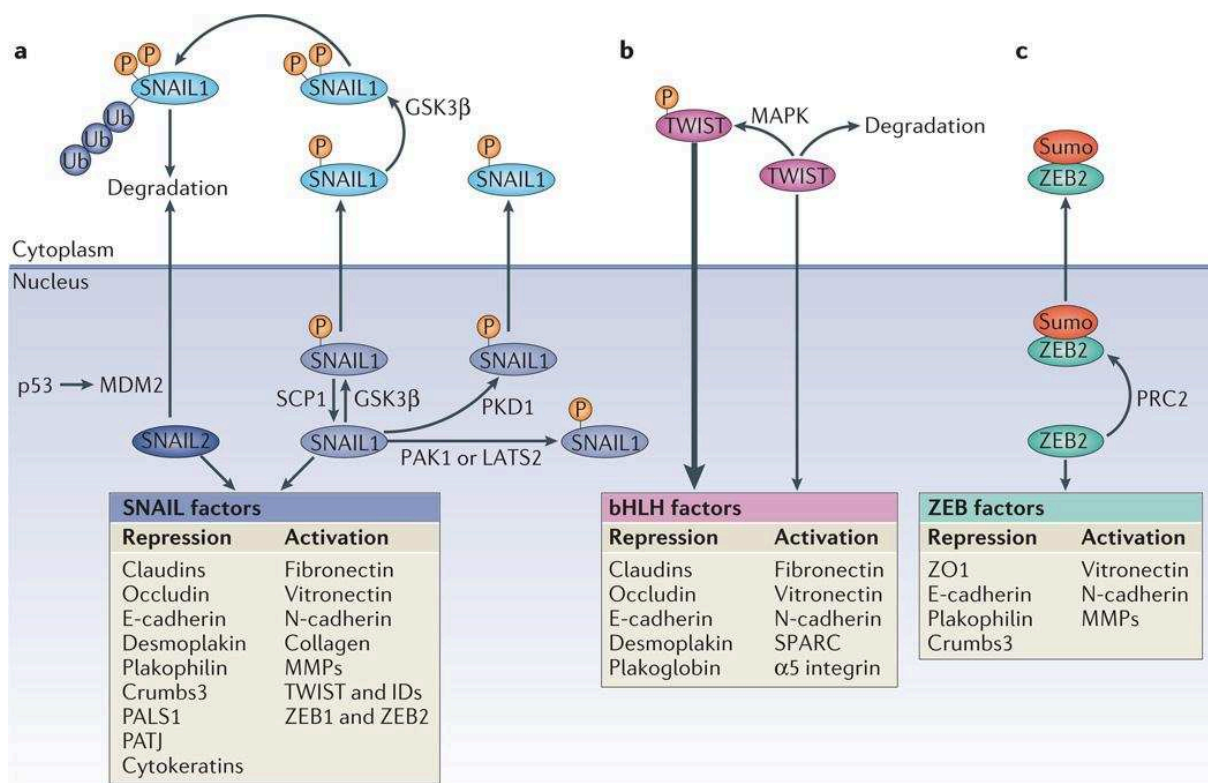


Fig 27. Schéma représentant le rôle et la régulation des facteurs de transcription intervenant dans la TEM. (pour revue [Lamouille 2014](#)).

3.2.4. La TEM dans les maladies pulmonaires

3.2.4.1. La FPI

L'accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes est un phénomène majeur dans le développement de la FPI. L'origine des myofibroblastes est multiple ; ces cellules pourraient i) dériver de la prolifération et l'activation des fibroblastes résidants dans le tissu pulmonaire, ii) provenir du recrutement de fibrocytes circulants, iii) ou être le résultat de la TEM des cellules épithéliales alvéolaires ([Andersson-Sjöland 2008](#), pour revue [Kendall 2014](#)).

Dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine, l'expression de TGF-β est augmentée dans les myofibroblastes, les fibroblastes, et les éosinophiles, plus particulièrement dans les zones fibrotiques ([Zhang 1995](#)). Son effet pro-fibrosant a également été démontré ([Degryse 2011](#)). L'activation de la TEM dans la fibrose pourrait être liée à une boucle d'activation autocrine de TGF-β ([Bonniaud 2005b](#)).

L'expression de miR-200a et miR-200c est réduite chez les patients atteints de FPI, comme dans des cultures de CEA exposés au TGF- β ([Yang 2012](#)). Les membres de la famille des miR-200 limitent la fibrose dans un modèle bléomycine murin ([Yang 2012](#)). Ces miR inhibent la TEM des CEA induite par le TGF- β en modulant l'expression de ZEB. De plus, la transfection de miR-200 dans des fibroblastes issus de patients FPI induit une diminution de leur caractère fibrosant (diminution d'expression d' α -SMA, de fibronectine).

Egalement, l'expression de miR-29, miR-30, miR-326 et de Let-7d, facteurs démontrés comme étant anti-fibrosant et/ou anti-TEM, est diminuée, tandis que l'expression de miR-21, miR-155 est augmentée chez les patients atteints de FPI (pour revue [Pandit 2011](#)).

La voie Wnt (non détaillée ici) impliquée dans la TEM au cours de l'embryogenèse, participe aussi au développement de la fibrose, comme en témoigne la surexpression de la voie Wnt dans les poumons de patients atteints de FPI ([Chilosi 2003](#)). Cette surexpression est associée à la diminution de miR (miR-375 et miR-487b) modulant l'association de Wnt à son récepteur, et à une augmentation de miR-154 ciblant des inhibiteurs de Wnt. Ces modulations de miR entraînent une activation de la voie Wnt ([Wang 2013](#), [Milosevic 2012](#)).

3.2.4.2. Le SDRA

Le phénomène de TEM au cours du SDRA n'a pas été clairement documenté. Cependant, on peut noter que parmi les nombreuses cytokines inflammatoires retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de SDRA, le TGF- β est présent de manière précoce ([Synenki 2007](#)). Dans des cultures in vitro et dans des modèles animaux de SDRA, l'inhibition du TGF- β permet une diminution de l'œdème en restaurant la clairance alvéolaire, permet de réduire l'inflammation, le dépôt de collagène, module la prolifération fibroblastique et la différenciation myofibroblastique ([Synenki 2007](#), [Nishioka 2004](#), [Pittet 2001](#)).

3.2.5. Rôle potentiel de l'hypoxie

In vitro, l'hypoxie sévère ou modérée semble induire la TEM des CEA, au moins dans des lignées de CEA ([Zhou 2009](#)). Le facteur HIF induit l'expression du TGF- β , qui est activé dans le milieu extracellulaire par les ROS ([Jiang 2007](#), [Zhou 2009](#), [Pociask 2004](#)).

De plus, le facteur de transcription pro-TEM TWIST1 est une cible de HIF1- α et de HIF2- α ([Yang 2008a](#), [Liu 2014](#)).

Enfin, plusieurs études sur des cellules épithéliales non pulmonaires (hépatocytes, cellules rénales) ont montré l'induction d'une TEM en hypoxie via le TGF- β et HIF-1 α ([Higgins 2007](#), [Copple 2010](#), [Manotham 2004](#)).

4. Les cellules souches mésenchymateuses

L'administration de cellules souches mésenchymateuses exogènes a montré des effets bénéfiques anti-inflammatoires et anti-fibrosants dans de nombreux modèles animaux d'agression alvéolaire, suggérant l'intérêt potentiel de ces cellules en thérapie cellulaire chez les patients.

Le corps humain est constitué de plus de 200 types cellulaires différents ([Gartner 2001](#)). Chaque type cellulaire possède des structures et des fonctions diverses, leur permettant d'exercer un rôle physiologique particulier. Leurs caractéristiques uniques sont permises grâce à la différenciation cellulaire, processus au cours duquel une cellule non spécialisée va exprimer ou réprimer de nombreux gènes, engageant ladite cellule dans une voie de spécialisation.

Les cellules non spécialisées, appelées cellules souches, sont des cellules ayant la capacité de se diviser à l'identique (capacité d'auto-renouvellement) et de s'engager dans différentes voies de spécialisation. Ces cellules souches sont primordiales à la vie, dès le 1^{er} stade embryonnaire jusqu'au renouvellement quotidien des cellules de l'organisme adulte. Selon leur degré de plasticité, on définira les cellules comme étant totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, et unipotentes.

4.1. Les cellules souches mésenchymateuses chez l'Homme

L'œuf est une cellule totipotente contenant le programme qui permet à une cellule unique de donner naissance à un individu constitué de centaines de types cellulaires différents coexistant et se divisant dans l'organisme adulte. Assez rapidement au cours de la segmentation les cellules vont perdre cette totipotence. En effet, au stade 16 cellules, seules les cellules de la masse cellulaire interne conservent une grande plasticité, gardant la capacité de former les 3 feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme). En revanche, elles sont incapables de former des tissus extra-embryonnaires essentiels au bon déroulement du développement de l'embryon. Ainsi, ces cellules sont dites pluripotentes. Cette réduction de plasticité résulte de l'inactivation de certains gènes par des phénomènes de méthylation de l'ADN et de modifications des histones (pour revue [Dang-Nguyen 2015](#)).

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules multipotentes dérivant du mésoderme. A l'âge adulte, on retrouve ces cellules souches mésenchymateuses (CSM)

principalement dans la moelle osseuse ([Ohgushi 1989](#)), le tissu adipeux ([Lin 2010](#)), la gelée de Wharton (le tissu conjonctif embryonnaire protégeant le cordon ombilical) ([Hou 2009](#)) ou encore le sang de cordon ombilical ([Gang 2004](#)). Il semble que des CSM puissent aussi être isolées à partir de tissus non mésodermiques tels que le poumon, le rein ou le foie.

4.2. Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses

Les CSM furent au départ définies sur la base de leur caractère prolifératif, leur capacité d'adhérence au plastique et la possibilité de les faire s'engager in vitro dans différentes voies de différenciation ([Friedenstein 1966](#), [Prockop 1997](#)).

Cependant, le vrai terme qui devrait être employé est « cellules stromales mésenchymateuses multipotentes ». En effet, aucune preuve directe du caractère souche in vivo n'a été établie, et de plus, toutes les cellules cultivées in vitro ne présentent pas ce caractère. L'isolement de cellules capables d'auto-renouvellement, c'est-à-dire capables de se diviser puis de maintenir une des deux cellules filles dans un état indifférencié, tandis que l'autre cellule fille se divise ou se différencie, n'a jamais pu être démontré de manière formelle.

Le terme de « cellules souches mésenchymateuses » doit être réservé quant à lui aux cellules répondant aux critères stricts définissant leur caractère souche. Cependant, ces cellules semblent très rares, car comparée à d'autres cellules souches retrouvées dans d'autres tissus adultes (peau, intestin, cellules souches hématopoïétiques), les cellules souches mésenchymateuses ne possèdent pas d'activité reverse-transcriptase de la télomérase, enzyme permettant de protéger les cellules de la sénescence répllicative ([Zimmermann 2003](#)).

Cependant, que ce soit les cellules souches mésenchymateuses, ou les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes, les deux termes gardent l'acronyme CSM (ou MSC en anglais).

4.2.1. Les marqueurs des CSM

En 2006, la société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT) a trois critères afin de définir le terme de « cellules stromales mésenchymateuses multipotentes » ([Dominici 2006](#), [Horwitz 2005](#)). D'une part, les cellules doivent adhérer au plastique en conditions de culture classique. D'autre part, elles doivent exprimer des marqueurs mésenchymateux, comme les

clusters de différenciation CD73 (SH3), CD90 (Thy-1) et CD105 (SH2), tandis qu'elles ne doivent pas exprimer d'antigènes correspondant au lignage hématopoïétique, en particulier CD45 (marqueur pan-leucocytaire), CD34 (marqueur des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules endothéliales), CD14 (marqueur monocytaire), CD19 (marqueur des lymphocytes B), CD3 (marqueur des lymphocytes T). De plus, les CSM doivent exprimer les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I mais non de classe II. Enfin, ces cellules doivent être capables de se différencier en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes en fonction des conditions de culture. Les CSM utilisées au cours des expériences réalisées au laboratoire EA2363 répondent précisément aux critères définis par l'ISCT.

4.2.2. Capacité de différenciation

L'ISCT définit les CSM comme des cellules ayant la capacité de se différencier in vitro après stimuli en ostéocyte, chondrocyte, adipocyte [Figure 28]. Cependant, certaines populations de CSM pourraient dériver de la crête neurale ([Morikawa 2009](#)). Aussi, selon leur état souche, et selon leur origine, une population de CSM semble capable de se transdifférencier in vitro sous l'influence de cocktails de facteurs de croissance en des cellules d'autres lignages, comme en cellules ectodermiques (neurocytes) ou endodermiques (hépatocytes, pancréatocytes) (pour revue [Ullah 2015](#), pour revue [Caplan 2001](#)). La transdifférenciation de CSM dans les lignées endodermiques et ectodermiques sont controversées in vivo (pour revue [Uccelli 2008](#)). Aussi, de plus amples recherches semblent nécessaire afin de mieux caractériser et définir ces potentielles sous-populations de CSM.

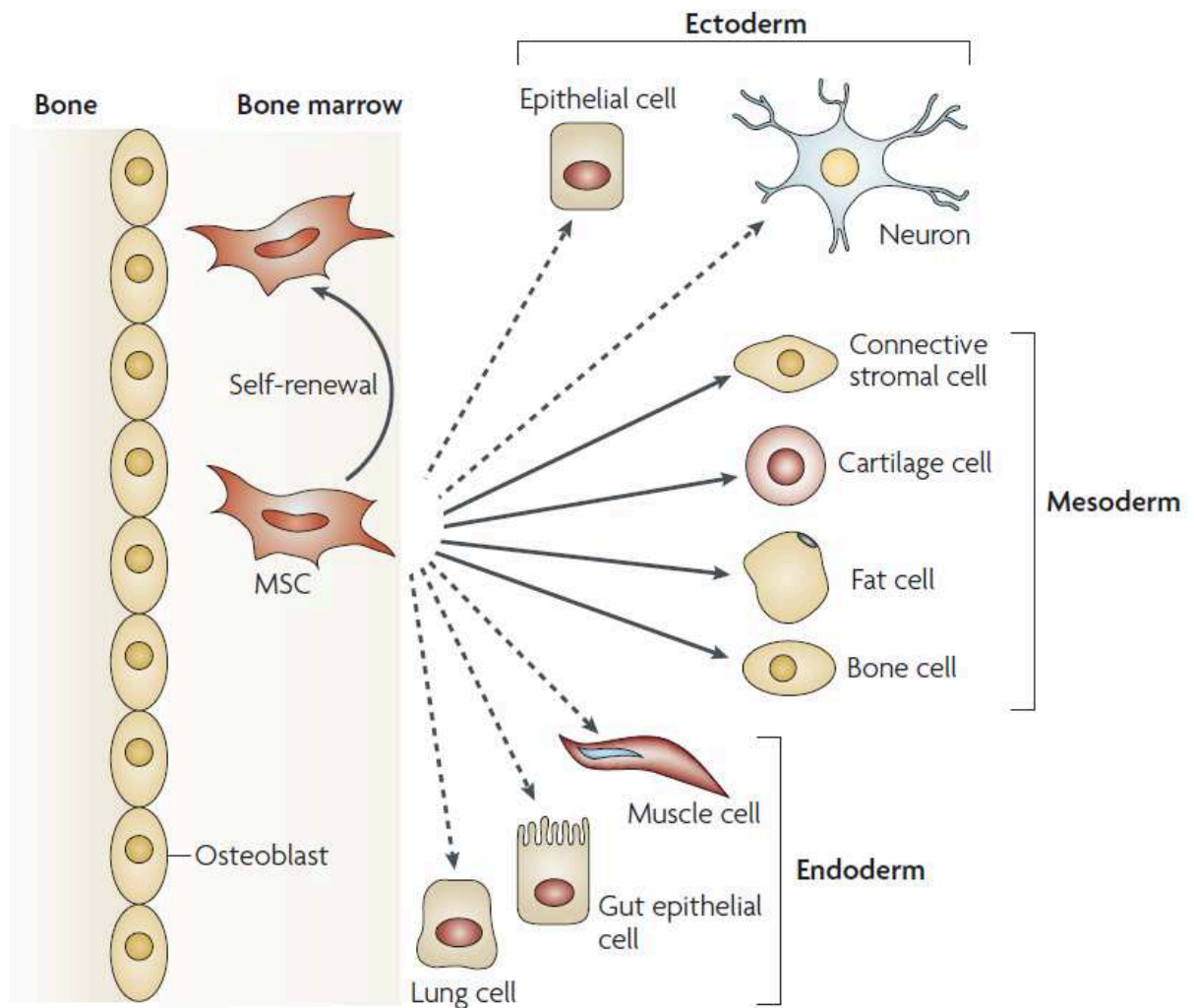


Fig 28. Schéma représentant la différenciation des cellules souches multipotentes issues de moëlle osseuse. Les cellules souches mésenchymateuses sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation, en cellules de la lignée mésenchymateuse (flèches en trait plein). Il se pourrait également que ces CSM puissent se différencier en cellules des lignées ectodermiques et endodermiques (flèches en pointillés) ([Uccelli 2008](#)).

4.2.3. Propriétés migratoires

Les CSM présentent des propriétés migratoires, capables de se mouvoir dans la circulation comme à travers les tissus, et de se greffer dans différents organes.

Ainsi, lors de lésions ou de changements physiologiques, des chimiokines permettent le recrutement de CSM aux sites d'intérêt. Suite à une inflammation, les CSM migrent d'une manière qui ressemble à celles des leucocytes qui roulent sur l'endothélium, en mettant en jeu les sélectines et VCAM-1 ([Rüster 2006](#), pour revue [Wu 2012](#)).

Les CSM expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines (CXCR1→6, CX3CR1, CCR1→10), bien que leur expression varie selon les études, ce qui peut être expliqué par les différences de conditions de culture et de provenance des CSM ([Ringe 2007](#)). Aussi, il a été montré qu'après un nombre important de passages (12 à 16), les CSM ne répondaient plus à la stimulation de certaines chimiokines, suite à la perte de récepteurs tels CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6 ([Honczarenko 2006](#)). Cette perte de réponse chimiotactique est accompagnée par une diminution de l'expression de certaines molécules d'adhérence (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, CD157), tandis que l'expression de marqueurs utilisés classiquement pour la caractérisation des CSM reste maintenue (CD90, CD105).

Chez l'homme, des chimiokines comme l'IL-8 (également appelé CXCL8) ou le MCP-1 (CCL-2) de chimiokines sont retrouvés dans des LBA ou le plasma de patients atteints de SDRA (pour revue [Wong 2004](#)).

4.2.4. Propriétés sécrétoires

Les CSM présentent un sécrétome très riche comportant notamment de nombreux facteurs solubles tels que des facteurs de croissance (KGF, HGF, TGF-β...), des cytokines (en majorité de l'IL-6 et de l'IL-8), des chimiokines (en majorité CCL2). Elles sécrètent également des exosomes et microvésicules contenant du matériel génétique (ARN, miRNA) ([Park 2009](#), [Kyukchiev 2014](#), [Ratajczak 2006](#)).

Les facteurs sécrétés interviennent dans de nombreux processus biologiques : interaction avec la MEC, interaction entre cellules, migration cellulaire, modulation de la réponse immunitaire, métabolisme... ([Sze 2007](#)).

Bien que l'analyse du sécrétome des CSM documente sur le potentiel de ces cellules, il est à noter l'importance des stimuli extérieurs qui influent sur l'expression du génome et sur le profil de sécrétion, notamment des cytokines anti-inflammatoires. De manière intéressante, le sécrétome des CSM, bien que non identique, est très similaire entre différents donneurs ([Park 2009](#)).

4.2.5. Propriétés immunomodulatrices

Outre leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, les cellules souches mésenchymateuses ont des propriétés immunomodulatrices [Figure 29].

4.2.5.1. Effets antiprolifératifs

Les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes T acteurs de la réponse immunitaire secondaire, que ce soit dans des cultures cellulaires autologues ou allogéniques ([Tse 2003](#)).

Cet effet anti-prolifératif passe par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0-G1, associé à l'inhibition de l'expression de la cycline D2. ([Glennie 2005](#)). Cette inhibition touche les lymphocytes T4, T8, les lymphocytes T naïfs et les cellules T mémoires. ([Krampera 2003](#)). L'inhibition de la prolifération des lymphocytes T passe par la sécrétion par les CSM de facteurs solubles tels que le TGF- β , la prostaglandine E2 (PGE2), le HLA-G et l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), ce dernier dégradant le tryptophane en métabolite toxique ([Terness 2002](#), [Frumento 2002](#)).

Les CSM inhibent également la prolifération des lymphocytes B et NK via des mécanismes paracrines et juxtacrines (pour revue [Uccelli 2006](#)).

A l'inverse, les lymphocytes T régulateurs, qui modulent la prolifération des autres populations de lymphocytes T, seraient induits par les CSM ([Djouad 2003](#)).

4.2.5.2. Effets anti-inflammatoires

Les capacités immunosuppressives des CSM reposent sur un dialogue avec les cellules du système immunitaire. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T telles que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL1- α ou l'IL1- β induit l'expression d'oxyde nitrique (iNOS) et de nombreuses chimiokines par les CSM. Ces dernières induisent la migration des lymphocytes T à proximité des CSM, où l'oxyde nitrique, instable et n'agissant qu'à un niveau local, va inhiber la prolifération des lymphocytes T, diminuer leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmenter la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, limitant ainsi la réaction immunitaire ([Ren 2008](#), [Beyth 2005](#)).

De plus, les CSM exercent un rôle immunomodulateur auprès d'autres types lymphocytaires. En effet, les lymphocytes B ont une activité, une mobilité et une production d'anticorps réduites in vitro en présence de CSM ([Corcione 2006](#), [Bochev 2008](#)).

Les CSM modulent la différenciation des monocytes et la maturation des cellules dendritiques, notamment par la sécrétion de PGE2 ([Djouad 2007](#), pour revue [Nauta 2007](#)).

Le TGF- β et la PGE2 produit par les CSM réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par les natural killer (NK) ([Frumento 2002](#), pour revue [Uccelli 2006](#), pour revue [Larghero 2009](#)).

La sécrétion d'IL-6 par les CSM permet d'autre part de limiter l'apoptose des neutrophiles, qui exercent un rôle important dans la lutte contre les infections bactériennes ([Raffaghello 2008](#)).

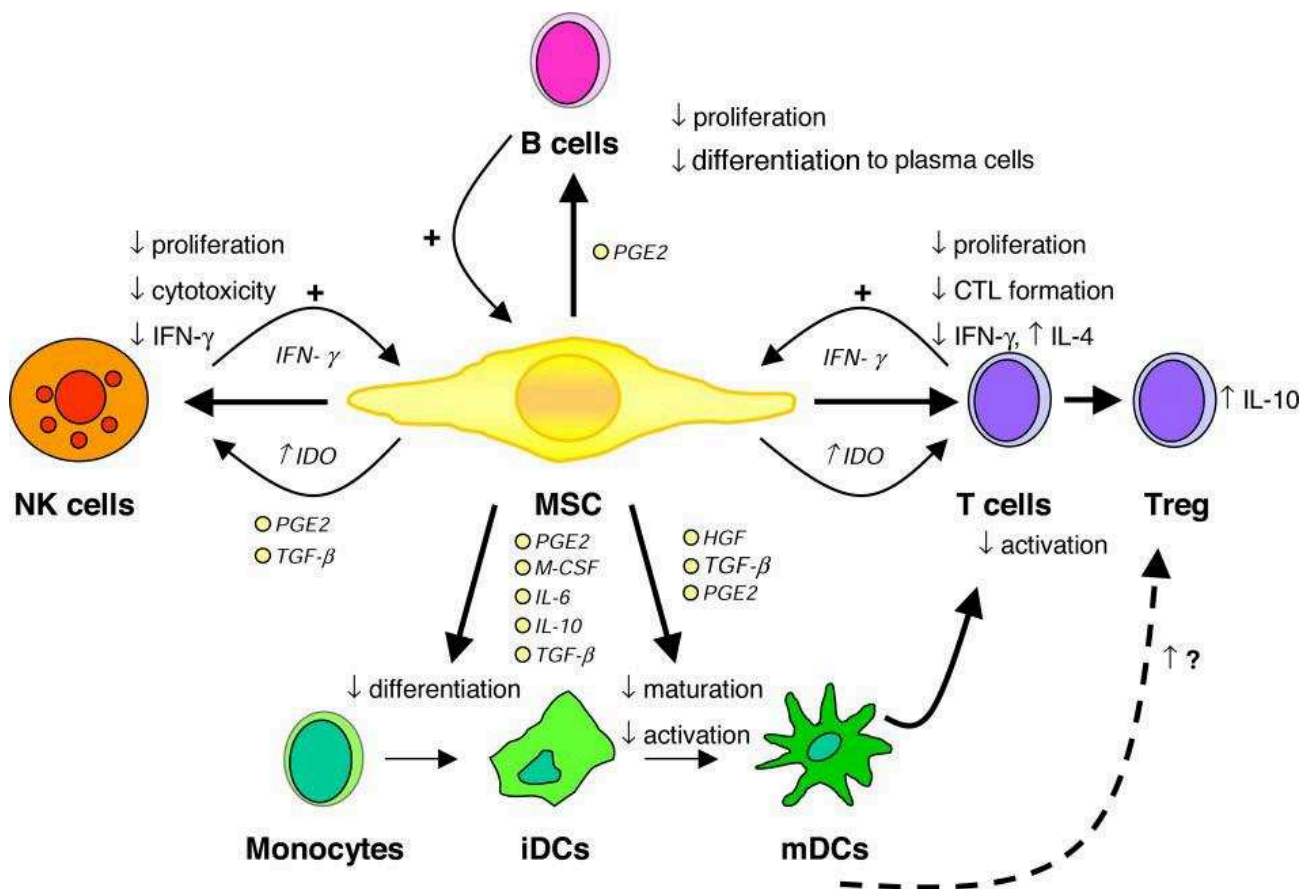


Fig 29. Effets immunomodulateurs des CSM (pour revue [Nauta 2007](#)).

4.3. Intérêt thérapeutique des CSM dans les pathologies respiratoires

4.3.1. Effet anti-inflammatoire et anti-bactérien

Dans de nombreux modèles murins de fibrose, les CSM isolées à partir de moelle osseuse ou de cordon ombilical réduisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires ([Moodley 2009](#), [Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#)). Cet effet anti-inflammatoire explique en partie l'effet protecteur des CSM chez ces animaux [Figure 30].

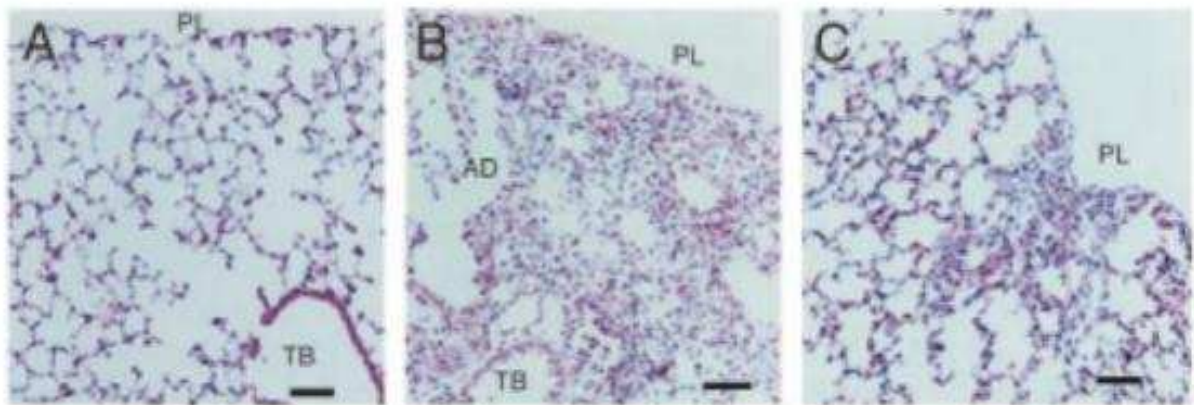


Fig 30. Réduction de la fibrose dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine. A. parenchyme pulmonaire contrôle, les alvéolaires sont aérées et bien cloisonnées. B. 14 jours après l'induction de la fibrose induite par la bléomycine, 55-60% du parenchyme pulmonaire comporte des zones d'inflammation. C. L'administration de CSM juste après l'instillation de bléomycine permet de limiter l'inflammation et de préserver – en partie – l'architecture pulmonaire (échelle 20 μ M) ([Ortiz 2003](#)).

Par exemple, il a été mis en évidence l'expression dans les poumons, 14 jours après exposition à la bléomycine, de cytokines pro-inflammatoires comme IFN- δ , IL-2, IL-1 β , and IL-4. La transplantation de CSM a permis de rétablir l'expression de ces cytokines à un niveau basal ([Rojas 2005](#)). De ce fait, la réduction de cette phase inflammatoire pourrait favoriser la réparation physiologique.

En présence de CSM, les taux de G-CSF et de GM-CSF, cytokines sécrétées par les cellules endothéliales favorisant la mobilisation des cellules souches endogènes, sont augmentées ([Hirohata 2002](#), [Rojas 2005](#)). Les animaux malades ayant reçu des CSM

survivent après 14 jours d'expérience (100% de survie vs 30%), bien qu'histologiquement, la restauration d'un parenchyme fonctionnel n'est que partielle.

Dans un modèle de SDRA induit par le LPS (LipoPolySaccharide) chez la souris, Gupta a montré que l'administration de CSM diminue l'expression de TNF- α et de MCP dans le lavage alvéolaire mais augmente l'expression d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire produite par les macrophages ([Gupta 2007](#)). Li a également mis en évidence chez le rat un rôle anti-inflammatoire du KGF ([Li 2015](#)). Enfin, dans ce même modèle, la surexpression de CXCR4 dans les CSM induit une augmentation de leur migration in vivo, une colonisation du tissu plus importante, et permet de stopper le développement de l'inflammation ([Yang 2015b](#)).

Bien qu'ayant des effets immunosuppresseurs, les CSM ont également des propriétés anti-bactériennes. En effet, les CSM exercent un rôle bénéfique dans les modèles de sepsis, améliorant les fonctions vitales, réduisant le nombre de bactéries dans la circulation sanguine. Cette clairance bactérienne pourrait s'expliquer par la sécrétion par les CSM d'IL-37 aux actions anti-microbiennes, par l'activation et la reprogrammation de macrophages, qui acquerraient des propriétés anti-inflammatoires et une activité phagocytaire accrue, et par la résistance à l'apoptose des neutrophiles induite par l'IL-6 (pour revue [Lee 2011](#), [Raffaghello 2008](#)).

4.3.2. Effet anti-fibrosant et anti-remodelage pulmonaire

Dans différents modèles de fibrose induite chez la souris (par la bléomycine, les radiations), les cellules souches mésenchymateuses ou embryonnaires permettent de prévenir la progression de la fibrose, contribuent à la réparation de l'épithélium alvéolaire, et limitent le remaniement de l'architecture pulmonaire ([Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#), [Moodley 2009](#)).

Les CSM ont également été étudiées dans des modèles animaux de bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO). L'administration de CSM, ou de milieu conditionné de CSM, permet de limiter la dégradation de la MEC, de réduire la mort par apoptose, d'induire la prolifération des petits vaisseaux sanguins dans un modèle d'emphysème induit par la cigarette ([Huh 2011](#)).

4.4. Mécanismes d'action des CSM

4.4.1. La greffe de cellules exogènes

Au début des années 2000, les premières données suggéraient le fait que les CSM se greffent au niveau de l'épithélium alvéolaire après lésions de manière durable ([Krause 2001](#), [Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#)). Avec l'utilisation de techniques plus poussées, il s'avère, après élimination des cellules mortes, des cellules autofluorescentes et des contaminations, que ce taux soit au final très faible (entre 0 et 5%) ([Chang 2005](#), [Kotton 2005](#), [Chen 2009](#)). Les faibles taux de « prise de greffe » pourraient être expliqués par le nombre de passage effectués des CSM avant instillation. Des études montrent que le taux de greffe de CSM est significativement diminué lorsque l'expansion des CSM a été réalisée en 5 passages, plutôt que lors d'une expansion sans passage (pour revue [Wu 2012](#)).

Il est probable que le phénotype des cellules exogènes détectées soit le résultat d'une fusion avec les cellules résidentes, plutôt que d'une différenciation propre des CSM (pour revue [Wagers 2004](#), [Spees 2003](#)). De plus, les cellules pulmonaires proviennent de l'endoderme, aussi il apparaît peu probable que des CSM, d'origine mésodermique, puissent s'engager dans la lignée endodermique. Les cellules détectées pourraient correspondre à des cellules souches pluripotentes isolées en même temps que les CSM, capables de s'engager dans la lignée endodermique. Cependant, cette explication semble hypothétique, au vu de la rareté de ces cellules ([Sarugaser 2009](#)). De plus, par comparaison, suite à l'administration de CSH (CS hématopoïétiques) d'origine mésodermique, aucune cellule n'est retrouvée dans le poumon après lésion ([Kotton 2005](#)). Également, des CSM isolées à partir de crête neurale ne se transdifférencient pas dans la moelle osseuse, suggérant une capacité limitée voire nulle des CSM à se différencier dans un autre lignage ([Takashima 2007](#)).

4.4.2. Sécrétion de facteurs solubles

Les CSM ne résidant dans le poumon que pendant une brève période, il est admis que les CSM agissent de manière paracrine. En effet, plusieurs études montrent que le milieu conditionné de CSM a le même potentiel protecteur que les CSM elle-mêmes ([Huh 2011](#), [Chen 2015](#), pour revue [Pawitan 2014](#)).

En contact ou à proximité des cellules endommagées, les CSM peuvent induire la prolifération des cellules locales, sécréter des facteurs de croissance et des composants du

stroma qui pourraient favoriser la régénération, et induire le renouvellement de la matrice extracellulaire, en limitant la production de collagène et de fibronectine ([Banerjee 2012](#)).

Les facteurs sécrétés par les CSM, en particulier le Keratinocyte Growth Factor (KGF), ont été montrés comme permettant de restaurer la clairance du fluide alvéolaire dans un modèle ex vivo de poumon humain traité par le LPS, et de réduire la perméabilité épithéliale aux protéines in vitro tout en augmentant le transport vectoriel de Na⁺ ([Lee 2009b](#), [Goolaerts 2014](#)). Le KGF présent dans le milieu conditionné des CSM augmente en effet l'expression à la membrane plasmique de la sous-unité α du canal sodique ENaC et donc son activité ([Goolaerts 2014](#)).

De nombreux facteurs, tels le l'Hépatocyte Growth Factor (HGF) ou la prostaglandine E2 (PGE2) participent également à l'effet bénéfique des CSM, en protégeant les CEA de l'apoptose, en induisant celle des myofibroblastes, en limitant la TEM induite par les agents fibrosants, ou en diminuant l'accumulation de collagène dans les poumons ([Dohi 2000](#), [Mizuno 2005](#)).

4.4.3. Sécrétion de microvésicules

Les CSM, à l'instar de nombreux types cellulaires, ont la capacité de sécréter dans le milieu extracellulaire des microvésicules, ou exosomes. Il s'agit de particules membranaires formées à partir d'endosomes et de granules de sécrétion puis libérées lors de leur fusion avec la membrane plasmique. Ces particules mesurent de 30 nm à 1 μ m de diamètre ([Ratajczak 2006](#)).

L'analyse du protéome des microvésicules de CSM humaines révèle pas moins de 730 protéines différentes, incluant de nombreuses protéines, telles que des enzymes anti-oxydantes et des facteurs de croissance ([Kim 2012](#), [Bruno 2012](#), [Deregibus 2007](#)). Par ailleurs, ces microvésicules contiennent également des lipides (dont la prostaglandine E2) jouant un rôle dans la réponse immunitaire ([Favaro 2014](#), [Ylöstalo 2012](#)) mais aussi des ARNm et micro-ARN (miRNA), permettant ainsi la transmission horizontale de matériel génétique d'une cellule à une autre ([Ratajczak 2006](#)). De précédentes études ont mis en évidence l'implication de ces miRNA dans l'effet protecteur des microvésicules dans des modèles d'agressions rénales ([Bruno 2009](#), [Bruno 2012](#), [Cantaluppi 2012](#)).

Dans un modèle murin de SDRA induit par le LPS, l'administration de microvésicules isolées de CSM humaines réduit l'œdème pulmonaire et la réaction inflammatoire ([Zhu](#)

2014). Cet effet est en partie expliqué par l'effet bénéfique du KGF contenu dans ces microvésicules.

De nouvelles données appuient le fait que les microvésicules jouent un rôle immunomodulateur dans les sécrétions paracrines des CSM (pour revue [Yáñez-Mó 2015](#)) [Figure 31].

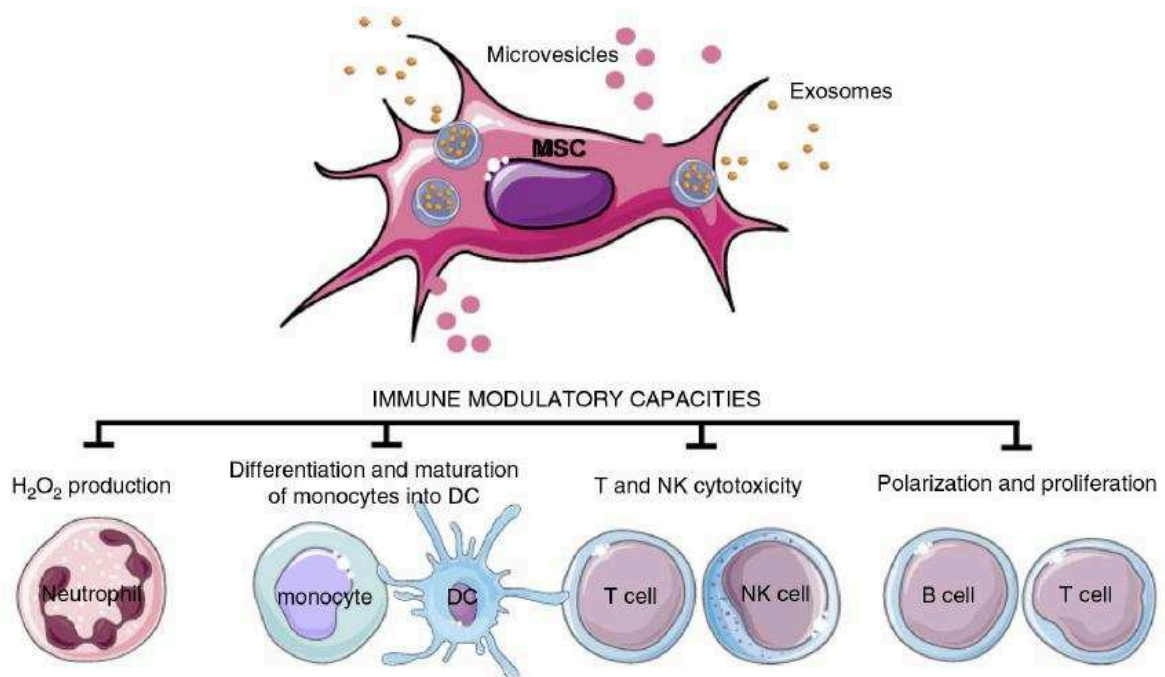


Fig 31. Effet immunomodulateur des microvésicules sécrétées par les CSM ([Yáñez-Mó 2015](#)).

De manière intéressante, l'hypoxie entraîne une sécrétion plus importante de microvésicules par les CSM qu'en condition normoxique in vitro. ([Bi 2014](#)).

4.4.4. Transfert de matériel par contact cellulaire

A l'instar des lymphocytes ([Önfelt 2004](#)), les CSM sont capables de former des contacts cellulaires avec des cellules environnantes via des nanotubes. Ces extensions cytoplasmiques formées par des microfilaments d'actine (F-actine) et de myosine sont des structures ultra fines, de 50 à 200 nm de diamètre, pour une longueur pouvant aller jusqu'à plusieurs fois la taille de la cellule. Ils permettent le passage de nombreux éléments cytoplasmiques, des composants membranaires, des vésicules membranaires, des miRNA, des facteurs de

croissance ou encore des mitochondries ([Rustom 2004](#), [Bruno 2009](#)) [Figure 32]. Bien qu'assez rares, des connexions entre nanotubes sont également possibles.

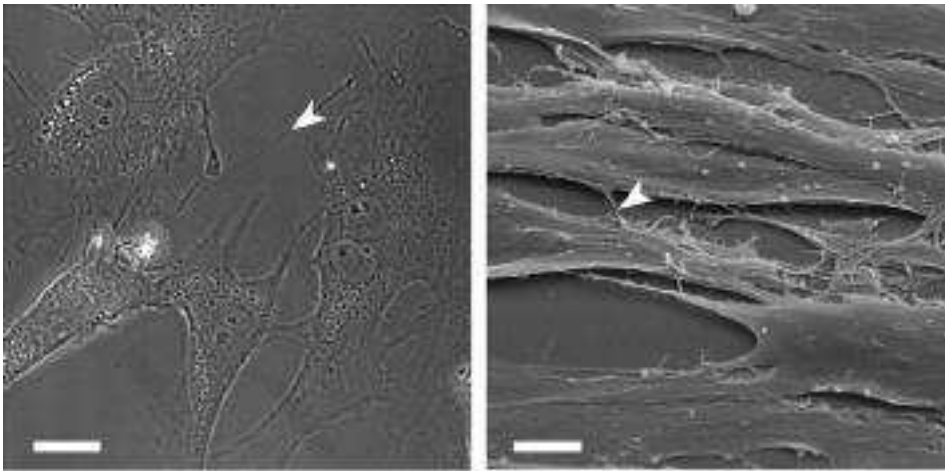


Fig 32. Formation de nanotubes entre des CSM et des cellules tubulaires rénales. Vue en microscopie en contraste de phase (à gauche, échelle 20 μ m) et en microscopie électronique à balayage (à droite, échelle 3 μ m) ([Plotnikov 2010](#)).

Le transfert de matériel peut se faire dans les 2 sens. Il a été montré que des CSM pouvaient transférer du matériel cytoplasmique avec des cellules tubulaires rénales et vice versa, ces dernières induisant ainsi la différenciation des CSM en cellules rénales ([Plotnikov 2010](#)).

Le transfert de mitochondries permet à des cellules épithéliales alvéolaires humaines issues d'adénocarcinome, des A549 déficientes en mitochondries (A549 ρ^0), de restaurer une respiration cellulaire ([Spees 2006](#)).

D'autre part, les CSM peuvent, à travers les jonctions communicantes, transférer du matériel cytoplasmique d'une cellule à une autre (dont les mitochondries), notamment avec les cellules épithéliales alvéolaires ([Badri 2011](#), [Islam 2012](#)). L'établissement de jonctions communicantes, mettant en jeu la connexine 43 (Cx43), est nécessaire au transfert de mitochondries et à l'action bénéfique des CSM dans un modèle d'inflammation au LPS chez la souris ([Islam 2012](#)).

4.5. Utilisation des CSM en thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire regroupe les stratégies reposant sur l'utilisation de cellules endogènes ou exogènes afin de lutter contre des pathologies diverses, en limitant leur progression ou en régénérant un organe lésé.

L'utilisation de cellules souches adultes est intéressante, dans le sens où elle permet de contourner les problèmes éthiques et immunologiques liés aux cellules souches embryonnaires.

Les CSM, par leurs propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires, cytoprotectrices et régénératrices, constituent des thérapies innovantes dans le traitement de pathologies associées à une hypoxie alvéolaire comme la FPI et le SDRA. Aussi, des essais cliniques de phase I et II sont actuellement en cours aux Etats-Unis dans ces deux pathologies (ci-dessusci-dessus).

Les bienfaits des CSM peuvent également être apportés dans des traitements luttant contre des pathologies perturbant la fonction respiratoire, tel l'asthme, la mucoviscidose, la bronchodysplasie, l'emphysème (pour revue [Garcia 2012](#)).

4.6. Vigilance sur l'utilisation des CSM

Bien que les espoirs de nouvelles thérapies cellulaires utilisant les CSM soient réels, certaines limites appellent à la nécessaire vigilance quant à leur utilisation chez l'Homme.

Le pool de CSM est hétérogène, et les fractions enrichies diffèrent selon les antigènes détectés, et selon la source de CSM (pour revue [Lv 2014](#)). De plus, la culture in vitro de CSM induit rapidement la perte de certains marqueurs caractéristiques (CD90, CD105) (Bonab 2006). La culture de CSM murines sur plusieurs mois induit la perte de leurs capacités de différenciation, acquièrent des anomalies génétiques et présentent des propriétés cancéreuses (augmentation de l'expression de l'oncogène c-myc, forte activité télomérase) ([Miura 2006](#)). L'injection de ces cellules chez la souris peut conduire à des tumeurs, disséminées dans l'organisme ([Wang 2005](#), [Tolar 2007](#)). Ce résultat résulte probablement du fait que des cellules anormales aient été isolées avec les CSM, ou que les CSM aient développé des anomalies en culture, et représente un frein à leur utilisation chez l'homme.

Ainsi, pour une utilisation thérapeutique à grande échelle, il est nécessaire d'une part de normaliser les conditions de culture *in vitro*, de manière reproductible et sécurisée, tout en continuant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires liées aux CSM.

5. Hypothèse et objectifs du travail de thèse

Le SDRA et la FPI sont deux pathologies graves du poumon profond fréquemment associées à une hypoxie alvéolaire, pour lesquelles il n'existe pas encore de thérapeutique réellement efficace. L'effet protecteur anti-inflammatoire et anti-fibrosant de l'administration de CSM observé dans divers modèles murins d'agressions alvéolaires suggère que la thérapie cellulaire utilisant des CSM pourrait représenter chez l'Homme une nouvelle approche thérapeutique au cours du SDRA ou la FPI (pour revue [Lee 2011](#), pour revue [Alvarez 2015](#)). Il est indispensable dans cette optique de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les CSM exercent leurs effets protecteurs vis-à-vis du poumon agressé. Jusqu'à présent, le rôle bénéfique des CSM dans les modèles murins a été principalement attribué à la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires et immunomodulateurs ([Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#), [Moodley 2009](#), [Aslam 2009](#), [Li 2015](#)), mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore complètement élucidés. En particulier, l'effet potentiel des CSM sur les CEA, qui jouent pourtant un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire du poumon distal, n'a été que très peu exploré.

Notre **hypothèse générale** est que les CSM pourraient, en plus de leurs effets paracrines anti-inflammatoires et immunomodulateurs, exercer un effet cytoprotecteur paracrine vis-à-vis de CEA agressées.

L'objectif général de notre travail a donc été de mettre en évidence in vitro un éventuel effet protecteur paracrine des CSM humaines vis-à-vis de CEA de rat en culture primaire exposées à une contrainte hypoxique, et d'identifier les mécanismes cellulaires mis en jeu dans cet effet protecteur.

Pour ce faire, nous avons utilisé **deux modèles d'étude in vitro** :

- Un modèle d'exposition prolongée des CEA à l'hypoxie en co-culture ou non avec des CSM qui nous a permis d'étudier l'effet des CSM sur la transition épithélio-mésenchymateuse des CEA induite par l'hypoxie (première étude)
- Un modèle d'exposition plus courte des CEA à l'hypoxie en l'absence ou en présence de milieu conditionné de CSM permettant d'étudier le rôle des CSM sur l'apoptose des CEA induite par l'hypoxie (seconde étude).

6. Effet des CSM sur les altérations phénotypiques induites par l'hypoxie chronique

6.1. Hypothèse de travail et objectifs

La fibrose pulmonaire idiopathique, qui constitue la plus fréquente et la plus grave des pneumopathies interstitielles diffuses chroniques, pose un véritable problème thérapeutique, malgré les nombreux essais thérapeutiques réalisés dans ce domaine. Récemment, deux nouvelles molécules, la pirfénidone et le nintedanib, ont certes obtenu une autorisation de mise sur le marché dans cette indication, mais les effets cliniques restent modérés avec essentiellement un ralentissement du déclin fonctionnel ([Noble 2011](#), [Richeldi 2014](#)). Les thérapeutiques actuelles ont une action très limitée dans le traitement des exacerbations aiguës et le ralentissement du développement de la maladie (pour revue [Song 2011](#), [Juarez 2015](#)).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines pourraient représenter dans ce contexte une approche thérapeutique particulièrement intéressante, notamment lors des phases d'exacerbation aiguës de la maladie qui présentent certaines analogies avec le SDRA. Un effet antifibrosant des cellules souches mésenchymateuses a en effet été décrit dans différents modèles animaux de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou les radiations ionisantes ([Ortiz 2003](#), [Moodley 2009](#), [Dong 2015](#)). Les mécanismes impliqués dans cet effet antifibrosant restent cependant mal compris.

Au cours de la fibrose, l'hypoxie alvéolaire induite par le remodelage pulmonaire et particulièrement marquée lors des phases d'exacerbation aiguë pourrait contribuer à la progression du processus fibrosant, comme cela a été décrit dans d'autres organes tels que la peau, le rein ou le foie ([Higgins 2007](#), [Haase 2009](#), [Zhou 2009](#)). L'expression du facteur de transcription HIF dans le poumon témoigne de cette hypoxie au cours des modèles murins de fibrose induite à la bléomycine mais également au cours de la fibrose pulmonaire chez l'homme ([Tzouvelekis 2007](#), [Weng 2014](#)).

Les CEA jouent un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire du poumon profond et leur implication au cours des processus fibrosants est bien reconnue. Bien que sa contribution à la fibrogénèse pulmonaire soit débattue (pour revue [Duffield 2013](#)), la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) constitue un phénomène qui implique directement les CEA, qui perdent progressivement leurs caractéristiques épithéliales, pour acquérir un phénotype

mésenchymateux, fibroblastique, voire myofibroblastique (pour revue [Lamouille 2014](#)). Phénomène physiologique au cours du développement, la TEM est décrite au cours de différents processus pathologiques comme la formation de métastases et l'invasion tumorale mais aussi au cours de la fibrose de différents organes comme le rein, le foie ou la peau. Parmi les facteurs favorisant la TEM, on compte notamment le TGF- β , principal facteur profibrosant ([Willis 2005](#)) et très vraisemblablement l'hypoxie ([Zhou 2009](#), [Higgins 2007](#)).

Dans cette première étude *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie chronique pourrait induire un phénomène de TEM dans les CEA de rat en culture, et que la co-culture avec des CSM humaines pourrait prévenir ce phénomène.

Les objectifs de cette étude ont été :

- de caractériser les modifications phénotypiques induites par l'hypoxie prolongée dans les CEA de rat en culture primaire
- d'évaluer l'effet des CSM humaines sur ces modifications phénotypiques dans un modèle de co-culture ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués.

Ces travaux ont été publiés à l'*American journal of physiology* (*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Dec 23:ajplung.00117.2015. doi: 10.1152/ajplung.00117.2015. [Epub ahead of print]. PMID : 26702148).

**Mesenchymal stem cells protect from
hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition**

Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Olivier Bernard¹, Dominique Marchant¹, Nicolas Dard¹,
Valérie Vanneaux³, Jérôme Larghero³, Thomas Gille^{1,2}, Christine Clerici^{4,5},
Dominique Valeyre^{1,2}, Hilario Nunes^{1,2}, Emilie Boncoeur^{1*} and Carole Planès^{1,2*}

* Emilie Boncoeur and Carole Planès equally contributed to this work.

¹ : Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Hypoxie & Poumon (EA 2363), F-93017 Bobigny, France ;

² : AP-HP, Hôpital Avicenne, F-93009, Bobigny, France ;

³ : AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France ; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475 Paris, France ;

⁴ : Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Inserm U1152, F-75018 Paris, France ;

⁵ : AP-HP, Hôpital Bichat, F-75018, Paris, France.

Running head: Mesenchymal stem cells and alveolar EMT

Corresponding author:

Pr Carole Planès

EA 2363, UFR SMBH

74 rue Marcel Cachin

F-93017 Bobigny, France

carole.planes@avc.aphp.fr

Phone: (33) 1 48 95 56 38 – Fax: (33) 1 48 95 56 32

Abstract

Administration of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (hMSC) reduces lung inflammation, fibrosis and mortality in animal models of lung injury, by a mechanism not completely understood. We investigated whether hMSC would prevent epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by hypoxia in primary rat alveolar epithelial cell (AEC). In AEC cultured on semi-permeable filters, prolonged hypoxic exposure (1.5% O₂ for up to 12 days) induced phenotypic changes consistent with EMT, i.e. a change in cell morphology, a decrease in transepithelial resistance (R_{te}) and in the expression of epithelial markers (ZO-1, E-cadherin, AQP-5, TTF-1) together with an increase in mesenchymal markers (vimentin, α -SMA). Expression of transcription factors driving EMT such as SNAIL1, ZEB1 and TWIST1 increased after 2h, 24h and 48h of hypoxia, respectively. Hypoxia also induced TGF β -1 mRNA expression and the secretion of active TGF β -1 in apical medium, and the expression of CTGF, two inducers of EMT. Co-culture of AEC with hMSCs partially prevented the decrease in R_{te} and in ZO-1, E-cadherin and TTF-1 expression, and the increase in vimentin expression induced by hypoxia. It also abolished the increase in TGF β 1 expression and in TGF β 1-induced genes ZEB1, TWIST1 and CTGF. Finally, incubation with rhKGF at a concentration similar to what was measured in hMSC conditioned media restored the expression of TTF-1 and prevented the increase in TWIST1, TGF β 1 and CTGF in hypoxic AEC. Our results indicate that hMSCs prevent hypoxia-induced alveolar EMT through the paracrine modulation of EMT signalling pathways, and suggest that this effect is partly mediated by KGF.

Key words: epithelial-mesenchymal transition, alveolar epithelial cells, hypoxia, Transforming Growth Factor β -1, Keratinocyte Growth Factor.

Introduction

Recent studies have reported the beneficial effects of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem (stromal) cell (MSC) in experimental models of acute lung injury (ALI) and pulmonary fibrosis, suggesting the potential interest of MSCs in future cell therapies in clinical lung diseases (2, 14, 25-27, 33-35, 42). Intravenous or intra-alveolar administration of MSCs attenuates the severity of lung damage, reduces lung inflammation and fibrosis, and increases survival of rodents after bleomycin, endotoxin-induced lung injury, live bacteria or ventilator-induced injury. The efficacy of MSC therapy has been mostly attributed to paracrine anti-inflammatory, anti-infectious or immunomodulatory functions (14, 18, 23, 26, 33-34). Interestingly, recent studies reported that MSCs could also exert paracrine or juxtacrine protective effects on alveolar epithelial cells (AEC) by ameliorating cell energetic, reducing apoptosis or restoring vectorial alveolar sodium transport (12, 19, 25, 34). Based on previous studies, we and others identified potential soluble factors that could be responsible for the observed beneficial paracrine effects of MSCs, such as keratinocyte growth factor (KGF), IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and prostaglandin E2 (PGE2) (12, 25, 33-34).

The protective effect of MSCs (or MSC conditioned media) on stressed AEC is particularly important because AEC (namely alveolar type 2 (AT2) cells) play a key-role in distal lung tissue homeostasis and repair, and because AEC are often altered or dysfunctional during lung injury. When submitted to acute injury like in ALI (6, 31) or to discrete but recurrent microinjuries like in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (22), AEC may undergo abnormal activation with production of pro-inflammatory or pro-fibrotic mediators, massive apoptosis or epithelial-mesenchymal transition (EMT), which lead to inefficient or aberrant alveolar repair and contribute to pulmonary fibrosis. EMT is a cellular process during which epithelial cells transdifferentiate into motile mesenchymal cells while losing their epithelial characteristics (24, 50). This phenotypic switch is mediated by key transcription factors such as SNAIL, zinc-finger E-box binding (ZEB) and basic helix-loop-helix transcription factors including TWIST (24). EMT can be induced in AEC by Transforming growth Factor β 1 (TGF β 1) or Endothelin-1 and by oxidative stress (10, 20, 21, 53). Indeed, it has been suggested that exposure to hypoxia, a condition usually encountered in alveoli during ALI or chronic lung injury with lung remodelling (51), could promote phenotypic changes in

alveolar epithelial cell lines consistent with EMT (57). Whether MSC therapy would limit or prevent alveolar EMT in case of acute or chronic lung injury is currently unknown.

The objective of the present study was therefore to examine *in vitro* the effects of human MSCs (hMSC) on EMT induced in rat primary AEC by prolonged hypoxic exposure, and the mechanisms involved. To achieve this goal, we established a co-culture system without cell/cell contact, with AEC grown on semi-permeable inserts (upper compartment and hMSC grown on the bottom of the wells (lower compartment. Results reveal that co-culture with hMSCs markedly attenuated phenotypic changes evoking EMT in rat AEC monolayers exposed to hypoxia (1.5% O₂) for up to twelve days. Indeed, co-culture with hMSCs completely blunted the increase in expression and secretion of the EMT inducer TGFβ1 in hypoxic AEC, as well as the induction of pro-EMT transcription factors ZEB1 and TWIST1 and of Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Finally, our data suggest that secretion of KGF by hMSCs could be partly responsible for this protective effect.

Methods

Isolation and culture of rat alveolar epithelial cells. The procedure of rat alveolar epithelial cell (AEC) isolation accorded with legislation currently in force in France, and animal welfare guidelines. Alveolar epithelial cells were isolated from young adult male pathogen-free Sprague-Dawley rats (5 week-old, 125g) by elastase digestion (Worthington, Lakewood, NJ, USA) as previously described (38). The percentage of AT2 cells as assessed by phosphine 3R staining of lamellar bodies was $\geq 92\%$ of freshly isolated cells, and cell viability was $> 95\%$. Cells were seeded onto Transwell/Snapwell (polycarbonate membrane with a pore size of $0.4 \mu\text{m}$, Corning Inc., Corning, NY, USA) filters, and cultured for up to 13 days in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine, 5% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, and cis-OH-proline (for the first 2 days) (Sigma-Aldrich) to selectively eliminate fibroblasts from AEC culture (53). Media were changed every 2 or 3 days. Transepithelial resistance (R_{te}) was measured every 3 days using a microvolt-ohmmeter (World Precision Instruments, Astonbury, UK). Phenotypic characterization showed that primary AEC under normoxic conditions retained characteristics of AT2 cells with increasing time in culture, such as expression of surfactant protein A, B and C mRNA transcripts (Fig. 1B), and expression of the thyroid-transcription factor (TTF-1) which was detected by Western blot and by immunofluorescence until day 13 after isolation (Fig. 2A-B). Aquaporine-5 (AQP-5) protein, a marker of alveolar type 1 epithelial cells (AT1 cells), was not detected by Western blotting at day 1 after isolation, but could be detected at day 3, day 6 and until day 13 (Fig. 1C) as previously reported (53), indicating that with increasing time in culture, AEC exhibit an intermediate phenotype with both type AT2 and AT1 cell characteristics. Concerning mesenchymal markers, α -smooth-muscle actin (α -SMA) was not detected at any time in culture in normoxic primary rat AEC cultures. Vimentin was exceptionally detected by Western blotting or immunofluorescence studies at day 4 or 6, and when this was the case, the cell culture was discarded because of possible fibroblast contamination. Forty separate AEC isolations and cultures were performed in this study, corresponding to 120 rats.

Extraction, culture and conditioning of human mesenchymal stem cells. Bone marrow samples were harvested from washed filters used during BM graft

processing for allogeneic transplantation after healthy donor informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France). Human mesenchymal stem cells (hMSC) were cultured as previously described (1). Briefly, healthy donors BM cells obtained after Ficoll (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were cultured at an initial density of $5 \cdot 10^4$ cells/cm² in minimum essential medium- α (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10% defined fetal calf serum (DFBS, HyClone, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (FGFb) (Invitrogen, France), antibiotic/antimycotic (Invitrogen, France). After 24–48 h, non-adherent cells were removed and the medium was changed. The media were changed every 2 or 3 days until confluence. Adherent cells were then trypsinized, harvested and cultured by seeding $0.5 \cdot 10^3$ cells/cm². Human MSC used in this study were obtained from 10 healthy donors, and cells were used at passages 2 to 5. Immunophenotyping of hMSC was performed according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), using monoclonal antibodies conjugated with either fluorescein isothiocyanate or phycoerythrin and directed to CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49a to CD49f), CD 90 and CD105, or matched isotype controls. Data were acquired and analyzed on a five parameters flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) with Cell Quest software. Detection of viable hMSC was performed by using the vital dye 7-AAD (Beckman Coulter) following the manufacturer's instruction. Cells were acquired by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson) and analyzed by CellQuest software (BD Bioscience). The expression of vimentin and α -smooth muscle actin (α -SMA) in hMSC under various experimental conditions was assessed by Western-blotting (see below) using anti-vimentin (1/3000) (Sigma-Aldrich) and anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (1/5000) (Sigma-Aldrich).

In some experiments, hMSC conditioned media (hMSC-CM) were used and prepared as follows. hMSCs at 80% confluence were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated in supplemented DMEM without FBS for 24h. Cell media were then collected and centrifuged at 13 000 rpm for 20 minutes. Supernatants representing hMSC-CM were immediately frozen and stored at -80°C. hMSC-CM were supplemented with 5% FBS before use. In some experiments, hMSC-CM were depleted in KGF using proteinG/agarose beads coated with anti-KGF monoclonal

antibody (R&D systems, Lille, France) or with anti-IgG antibodies (as a control) as previously described (12). KGF concentrations in hMSC-CM were measured using specific Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) before and after KGF depletion to verify the efficacy of the procedure.

Co-cultures of rat alveolar epithelial cells and human mesenchymal stem cells. A co-culture system without cell/cell contact was used to test the paracrine effect of hMSCs on AEC phenotype (Figure 1A). On day 1 after AEC isolation, Transwell inserts seeded with AEC (seeding density: 1.3×10^6 cells/cm²) were transferred into plastic dishes seeded with hMSCs (80 000 cells/cm²) at the bottom of the wells. Co-cultures of AEC (upper compartment) and hMSCs (lower compartment) were maintained in DMEM supplemented with 5% FBS and antibiotics/antifungal treatment for 6 or 12 days, with culture medium changed every 3 days. For 12 day-cocultures, hMSCs at the bottom of the wells were replaced after 6 days when confluence was reached by “fresh” hMSCs from the same donor (seeding density: 80 000 cells/cm²).

Exposure of cells to hypoxia and drugs. At day 1 after isolation, AEC cultured alone or in co-culture with hMSCs were placed in a humidified airtight incubator with inflow and outflow valves and exposed to a hypoxic gas mixture containing 1.5% O₂ - 5% CO₂ - 94.5 % N₂ (oxygen tension in culture media: 45 mmHg), and kept at 37°C for increasing periods of time (from 2 hours to 12 days). Control normoxic cells were maintained in a 21% O₂ - 5% CO₂ - 74% N₂ humidified incubator for the same periods of time (oxygen tension in culture media: 140 mmHg). In some experiments, AEC cultured alone were incubated at day 1 after isolation with increasing concentrations of human recombinant KGF (rhKGF, R&D Systems, Lille, France; final concentrations: 125, 250 or 500 pg/ml) and exposed to hypoxia for 24 or 48 hours. In other experiments, AEC were pre-incubated for 2 hours with SB431542, an inhibitor of TGF-β1 type I receptor kinase (Sigma-Aldrich; final concentration: 10μM) (57), before exposure to hypoxia, and treatment with SB431542 was maintained throughout hypoxic exposure for up to 6 days.

Immunofluorescence stainings. AEC monolayers cultured on Transwell filters were harvested after 6 and 12 days of hypoxic/normoxic exposure. Filters were rinsed twice with ice-cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at 4°C, then rinsed with PBS and permeabilized with 0,1% Triton X-100 for 15 minutes.

After rinsing with PBS, cells were incubated in PBS with 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes to block nonspecific binding sites. Monolayers were exposed to the primary antibodies (Ab) for 1 hour at room temperature (RT). The following antibodies for detection of epithelial markers were used with respective dilutions: mouse polyclonal anti-TTF-1 (Invitrogen) (1/50), rabbit polyclonal anti-zonula-occludens-1 (ZO-1) (Sigma-Aldrich) (1/200), mouse polyclonal anti-E-cadherin (Sigma-Aldrich) (1/300). Antibodies used for detection of mesenchymal markers were mouse polyclonal anti-vimentin (Sigma-Aldrich) (1/300) and mouse polyclonal anti- α -smooth-muscle actin (α -SMA) (Sigma-Aldrich) (1/300). After extensive washing with PBS, cells were then exposed to the appropriate secondary Ab (1/200) conjugated with Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-568 (Invitrogen, France) protected from light for 30 minutes at RT. Filters were incubated with DAPI (300 nM) to stain nuclei for 30 sec and washed again. Filters were then mounted with mounting solution Immumount (Thermo-scientific) and viewed with a Zeiss microscope equipped with epifluorescence optics. Images were captured on an integrated camera (Qimaging Retiga 2000R with Image-proexpress 6.0) at X400 and imported as TIFF files.

Western blot analyses. AEC in 24-mm Transwell filters were washed twice, scraped off the filters in ice-cold PBS, and centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 30 μ l of ice-cold lysis buffer containing H₂O, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS and protease inhibitors (0.01%) and kept on ice for 1 hour. Cell lysates were then centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C. Samples (30 μ g protein per sample in Laemmli buffer containing 5% β -mercapto-ethanol) were then resolved through 7.5% or 10% acrylamide gels, electrically transferred to nitrocellulose paper, and probed with the following antibodies at respective dilutions: anti-TTF-1 (Dako) (1/200), anti-E-Cadherin (1/3000), anti-AQP-5 (Sigma-Aldrich) (1/200), anti-vimentin (1/3000), anti- α -SMA (1/5000), anti-SNAIL1 (Cell Signaling) (1/500), anti-ZEB1 (Santa Cruz) (1/500), anti-HIF1- α (Novus biotechnologies) (1/500), anti-HIF2- α (Novus biotechnologies) (1/1000), anti-Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (Novus biotechnologies) (1/500) and anti- β -actin (Sigma-Aldrich) (1/2000). The signals were quantified by densitometric analysis using NIH image software, normalized using quantification of the β -actin signal in each lane and expressed in arbitrary units.

Measurement of active TGF- β 1 in cell supernatant. AEC grown on Transwell filters were exposed to normoxia or hypoxia (alone or in co-culture with hMSCs) for 24h, as indicated previously. The apical supernatants were collected, spun at $12,000 \times g$ for 15 minutes at 4 °C, and stored at -80 °C for further processing. The concentrations of active TGF- β 1 were determined using specific Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

RNA Extraction and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Total cellular RNA from AEC cells cultured in normoxic or under hypoxic conditions was extracted using an RNeasy kit (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The eluted RNA was quantified using a Biospec-Nano (Shimadzu, Noisiel, France) at 260 nm. Single-strand cDNAs were synthesized from 0.5 μ g of total RNA using maxima first strand cDNA synthesis kit composed by a mixture of oligo (dT) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions (Fisher Scientific, Illkirch, France). Resulting cDNA samples were amplified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Absolute qPCR SybrGreen Rox mix (Fisher Scientific, Illkirch, France) on StepOne system qPCR (Applied Biosystem, Life technology, France). Cycle threshold values were normalized to amplification of the beta-actin gene. For each transcript, the expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, as detailed by the manufacturer. Length and sequence of primers used for quantitative real-time PCR are described in table 1.

Statistical analyses. Results are presented as means \pm SE. Differences between groups were evaluated with unpaired t test for comparisons between 2 groups, and otherwise with one-way variance analyses (ANOVA) and, when allowed by the F value, results were compared by the modified least significant difference (Fisher's PLSD). $p < 0.05$ was considered significant. StatView[®] software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all analyses.

Results

Effect of prolonged hypoxic exposure on rat alveolar epithelial cell phenotype.

The effects of hypoxia on AEC phenotype were assessed after 6 and 12 days of exposure by changes in R_{te} , cell morphology and expression of a panel of epithelial or mesenchymal markers. Hypoxia induced a progressive and significant decrease in R_{te} ($1635 \pm 395 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs $328 \pm 41 \Omega \cdot \text{cm}^2$ after 6 days of normoxic or hypoxic conditions, respectively; $p < 0.001$), indicating an alteration of AEC tight junctions under hypoxic condition. Exposure to hypoxia for 6 days did not modify the expression level of E-cadherin as assessed by immunostaining and by Western blot (Fig. 2A-B). The expression of the junctional protein ZO-1 was detected by immunostaining and remained peripheral in hypoxic AEC (Fig. 2A). By contrast, hypoxia induced a marked decrease in the nuclear expression of the epithelial transcription factor TTF-1 as assessed by immunostaining (Fig. 2A), as well as a 70% decrease in TTF-1 protein expression by Western blotting (Fig. 2B). Indeed, hypoxic exposure induced a 53% decrease in AQP-5 protein expression levels by Western blot (Fig. 2B). The mesenchymal markers vimentin and α -SMA were detected neither in normoxic nor in hypoxic AEC at day 6 (Fig. 2A). Exposure to hypoxia for 12 days amplified the changes in AEC phenotype (Fig. 2C and 2D). Expression of the epithelial markers ZO-1, E-cadherin and TTF-1 was hardly detected by immunostaining after 12 days of hypoxia (Fig. 2C), and Western blot analysis confirmed that E-cadherin and TTF-1 protein expression were strikingly reduced in hypoxic AEC (Fig. 2D). By contrast, expression of the mesenchymal marker α -SMA was detected in hypoxic AEC (Fig. 2C and 2D). Indeed, the protein expression level of vimentin was significantly increased in hypoxic AEC as compared with normoxic cells (Fig. 2C and 2D). All together, these data indicate that prolonged hypoxic exposure induced a profound change in AEC phenotype consistent with EMT. Of note, the progressive decrease in epithelial markers (TTF-1 and AQP5) was also observed when hypoxic exposure started on day 3 (and not on day 1) after isolation, indicating that the phenotypic changes induced by hypoxia were not simply due to the fact that hypoxic exposure began the first day after isolation when AEC in culture were not stable.

Effect of prolonged hypoxia on hMSC phenotype. We tested whether prolonged exposure to hypoxia or co-culture with AEC would modify hMSC phenotype and viability (Fig. 3). Prolonged hypoxic exposure didn't alter hMSC viability either when cultured alone (95.2 vs 96.5 % viable cells in normoxia and hypoxia, respectively) or when co-cultured with AEC (95.6 vs 92.8 % viable cells in normoxia and hypoxia, respectively). Following 6 days of hypoxic exposure, no significant change was detected in hMSC morphology (Fig. 3A), in the expression of hMSC cell surface markers (i.e. CD29, CD44, CD49a to CD49f, CD73, CD90 and CD105) (Fig. 3B), or in the protein expression of α -SMA and vimentin (Fig. 3C), indicating that hMSCs did not transform themselves into activated fibroblasts (myofibroblasts) when submitted to chronic hypoxia.

Effect of hMSC co-culture or of hMSC conditioned media on phenotypic changes of AEC induced by prolonged hypoxia. Co-culture experiments revealed that R_{te} was significantly higher in AEC monolayers co-cultured with hMSCs than in AEC monolayers without hMSC after a 6 day-hypoxic exposure (Fig. 4A). Immunostaining studies showed that co-culture of AEC with hMSC allowed AEC to maintain their epithelial phenotype under hypoxic condition (6 day-exposure) (Fig. 4B): ZO-1 and TTF-1 expression were restored in hypoxic AEC monolayers co-cultured with hMSCs. Similar observations were made when AEC were incubated with hMSC-conditioned media (hMSC-CM) for 6 days under hypoxic exposure (Fig. 4B). Western-blot experiments confirmed that TTF-1 protein expression was restored in hypoxic AEC co-cultured with hMSCs (Fig. 4C). The effect of hMSC co-culture on AEC phenotype was also evidenced after a 12 day-hypoxic exposure (Fig. 4 D-F). Transepithelial electric resistance was significantly decreased under hypoxic condition in AEC monolayers cultured alone but not when co-cultured with hMSCs (Fig. 4D). By immunostaining, the expression of ZO-1 and TTF-1 was completely abolished in hypoxic AEC cultured alone, but was clearly visible in AEC co-cultured with hMSCs (Fig. 4E). Also, hypoxia-induced decrease in the protein expression of E-cadherin and TTF-1 as assessed by Western-blotting was completely prevented by co-culture of AEC with hMSCs (Fig. 4F). Finally, co-culture with hMSCs tended to decrease vimentin protein expression in hypoxic AEC (2.09 ± 0.46 vs 0.97 ± 0.31 arbitrary units in $1.5\%O_2$ and $1.5\%O_2 + hMSCs$, respectively; $n=3-5$; $p=0.10$).

Effect of hMSC on Hypoxia-Inducible Factor expression in alveolar epithelial cells. To decipher the cellular mechanism(s) involved in the beneficial effect of hMSCs on AEC exposed to prolonged hypoxia, we first evaluated whether co-culture with hMSCs did modify the expression of HIF1- α and HIF2- α in hypoxic AEC (44). Stabilization of HIF1- α proteins was previously shown to be necessary in AEC for developing hypoxia-induced EMT (57). As shown by Western-blotting (Fig. 5A and 5B), HIF1- α protein was hardly detected in normoxic AEC but was significantly induced in AEC exposed to hypoxia for 2 and 3 hours. HIF2- α protein expression began to increase at 3 hours of hypoxia, but this increase was not significant. Both HIF1- α and HIF2- α protein expression levels were significantly increased in hypoxic AEC after a 24h-exposure, but went back to normoxic values after 48h of hypoxia (Fig. 5C to 5F). Neither HIF1- α protein expression nor HIF2- α protein expression were modified when hypoxic AEC were co-cultured with h-MSCs (Fig. 5B, 5D, 5F).

Effect of hMSC on transcription factors driving EMT in hypoxic alveolar epithelial cells. The temporal expression pattern of transcription factors known to induce EMT such as SNAIL, ZEB1 and TWIST1 (24) was established in AEC exposed to hypoxia for increasing times (from 2 to 48 hours). Expression levels of SNAIL-1 mRNA transcripts were not modified by hypoxic exposure (Fig. 6A) but as shown in Figure 6B, expression of SNAIL1 protein was significantly induced by short hypoxic exposures (2 and 3 hours) and rapidly decreased to reach normoxic values afterwards. Expression levels of SNAIL2 (SLUG) mRNA transcripts decreased by approximately 50% during the first hours of hypoxic exposure but went back to normal after 16 hours of exposure (not shown). Expression levels of ZEB1 and TWIST1 mRNA transcripts were significantly increased after 24 and 48 hours of hypoxic exposure, respectively (Fig. 6C and 6D). ZEB1 protein expression was not modified by a 24h-hypoxic exposure (data not shown). We then examined whether co-culture of AEC with hMSCs could modulate the expression of expression of SNAIL1, ZEB1 and TWIST1. Co-culture with hMSCs had no effect on hypoxia-induced expression of SNAIL1 protein (Fig. 6B). By contrast, co-culture completely prevented the increase in ZEB1 and TWIST1 mRNA levels in hypoxic AEC (Fig. 6C and 6D).

Effect of hMSC on profibrotic factor expression in alveolar epithelial cells.

We next studied whether co-culture with hMSCs could affect the production of 2 profibrotic proteins in hypoxic AEC known to favour EMT: Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) and Connective Tissue Growth Factor (CTGF) (48, 53). As shown in Figure 7A, TGF β 1 mRNA levels increased two-fold after 24 hours of hypoxia, and decreased thereafter (not shown). Also, the concentration of TGF β 1 in the apical medium of hypoxic AEC was strikingly increased as compared with normoxic condition (Fig. 7B). The mRNA and protein expression of CTGF, a target of TGF β 1, was induced as well by a 48 hour hypoxic exposure (Fig. 7C-D). Interestingly, co-culture with hMSCs completely blunted the increase in TGF β 1 mRNA expression as well as TGF β 1 protein apical secretion induced by hypoxia (Fig. 7A and 7B). Co-culture with hMSCs suppressed as well the two-fold increase in CTGF mRNA expression induced in AEC by a 48 hour-hypoxic exposure (Fig. 7C), and blunted the increase in CTGF protein expression (7D). To study the role of TGF β 1 autocrine signalling in hypoxia-induced alterations of AEC, hypoxic AEC were incubated with SB431542, an inhibitor of ALK5, a TGF β 1 type I receptor kinase (57). As shown in Fig. 7E-F, SB431542 completely prevented the hypoxia-induced increase in TWIST1 and CTGF mRNA transcripts observed after 48 hours of hypoxic exposure. SB431542 also prevented the decrease in TTF-1 expression as assessed by immunostaining after 6 days of hypoxia (Fig. 7G). Taken together, these data strongly support the importance of the TGF β 1 pathway in hypoxia-induced EMT, and indicate that hMSC co-culture down-regulates the expression of TGF β 1 and its target genes.

Involvement of Keratinocyte Growth Factor secretion in the paracrine effects of hMSC. Keratinocyte Growth Factor (KGF), a well-known growth factor for AEC that is secreted by hMSCs (25, 36), has been previously shown to be involved in the beneficial effect of hMSC conditioned media on transepithelial sodium transport across AEC monolayers exposed to hypoxia and inflammatory cytokines (12). Therefore, we investigated the potential role of KGF in our model. Mean KGF concentration measured by ELISA in hMSC-CM was 274 ± 33.8 pg/ml (n=13). Treatment of hypoxic AEC with increasing concentrations of rhKGF (125, 250 or 500 pg/ml) showed that 250 and 500 pg/ml rhKGF completely prevented the increase in

TGF β 1 mRNA levels induced by a 24-hour hypoxic exposure, whereas 125 pg/ml had no significant effect (Fig. 8A). Recombinant human KGF at the concentration of 250 pg/ml was therefore used in subsequent experiments. Treatment with rhKGF for 48h fully prevented the increase in TWIST1 and CTGF mRNA transcript levels (Fig. 8 B-C) induced by hypoxia, whereas it did not affect the increase in ZEB1 mRNA expression at 24 hours (data not shown). Also, treatment with rhKGF throughout a 6-day hypoxic exposure completely prevented the hypoxia-induced decrease in TTF-1 protein expression (Fig. 8 D). Finally, Figure 8E shows that hMSC-CM completely depleted in KGF using anti-KGF antibody failed to prevent the hypoxia-induced increase in TWIST mRNA transcripts at 48h of hypoxia, whereas complete hMSC-CM or hMSC-CM treated with nonspecific anti-IgG did.

Discussion

The main findings of the present study can be summarized as follows. Prolonged exposure to hypoxia induced phenotypic changes in primary rat AEC consistent with EMT, i.e. a change in cell morphology, a progressive decrease in R_{te} and in the expression of epithelial markers (ZO-1, E-cadherin, AQP-5 and TTF-1) together with an increase in mesenchymal markers (vimentin and α -SMA). Hypoxia induced the expression of hypoxia-inducible factors HIF1- α and HIF2- α , as well as the expression of transcription factors driving EMT such as SNAIL1, ZEB1 and TWIST1 with a specific time-course. Hypoxic exposure also increased TGF β -1 mRNA expression and the secretion of active TGF β -1 in apical medium, and the expression of CTGF, two profibrotic mediators known to induce EMT. Co-culture of AEC with bone marrow-derived hMSCs (or incubation with hMSC-CM) partially prevented the decrease in R_{te} and fully prevented the decrease of ZO-1, E-cadherin and TTF-1 expression, and the increase in vimentin expression induced by hypoxia. Co-culture completely blunted the increase in TGF β 1 expression and in ZEB1, TWIST1 and CTGF mRNA levels, whereas it did not affect HIF1- α , HIF2- α and SNAIL1 protein expression in hypoxic AEC. Finally, incubation with rhKGF at a concentration similar to what was measured in hMSC-CM fully restored the expression of the epithelial transcription factor TTF-1 in hypoxic AEC, and prevented the increase in TWIST1, TGF β 1 and CTGF expression. Taken together, our data indicate that hMSCs protect primary AEC from hypoxia-induced EMT through the paracrine modulation of EMT signalling pathways, and suggest that this effect is partly mediated by KGF secretion.

One limitation of the present study is the fact that the *in vitro* model used combined cells originating from two different species, i.e. primary rat AEC and hMSCs. Bone marrow-derived MSC were studied for obvious reasons inasmuch as these cells will likely be used in the next future for cell therapy in patients with pulmonary diseases. Unfortunately, human alveolar epithelial cell lines such as A549 show several pitfalls for the study EMT in the context of lung fibrosis, for instance a very low R_{te} , basal expression of mesenchymal markers, a short doubling time and cancerous characteristics (57). Primary rat AEC are usually considered as good surrogates for human AEC which are very difficult to isolate. Noteworthy, previous

studies have shown that hMSCs were effective *in vivo* in several rodent models of injury (5, 28-29), probably because most paracrine factors secreted by MSC (KGF, IL1- α or PGE2) show considerable homology across species. Indeed, it is well recognized that recombinant human proteins (rhKGF and rhIL1- α) have a biological effect on rodent AEC (11, 36). The fact that we observed a clear beneficial effect of hMSCs on rat AEC indicates that our model, despite the species difference, still represents a valuable tool for studying *in vitro* the crosstalk between AEC and MSCs.

Prolonged exposure to hypoxia (1.5% O₂, corresponding to an O₂ tension of approximately 45 mmHg in culture media) was used in this study to induce EMT in primary AEC because alveolar hypoxia is usually associated with acute or chronic lung injuries leading to pulmonary fibrosis, due to pulmonary oedema or to distal lung remodelling (6, 31). Indeed, AT2 cells from patients with IPF or from mouse lungs treated with bleomycin specifically express HIF1- α and HIF1- α related genes (51), and alveolar hypoxia may be particularly important during episodes of acute exacerbation in the course of IPF (22). Hypoxia promotes EMT in a large number of cancerous cells, a phenomenon involved in the development of tumours (56). Local hypoxia has also been shown to induce EMT in non-cancerous epithelial cells from various organs, including the kidney, skin and nasal polyps (16-17, 46). In renal tubular epithelial cells, hypoxia-induced EMT is partly dependent on the expression of HIF1- α and CTGF, and could participate in the development of renal fibrosis (15-17). Whereas the role of AEC abnormal secretory phenotype in the pathophysiology of pulmonary fibrosis is well-admitted (22), the role of EMT is more controversial, owing to the difficulty to study EMT *in vivo*. Mouse studies using genetic tools to follow the fate of specific cell types in bleomycin-induced pulmonary fibrosis gave discordant results. For instance, Tanjore et al. reported that approximately one third of lung fibroblasts in the bleomycin model originated from alveolar epithelium (49), but Rock et al. found no evidence for EMT (41). Whatever the importance of EMT in pulmonary fibrosis, our data provide evidence that hypoxia at least induces profound phenotypic changes in AEC, which may impair their ability to repair alveolar damage.

In a recent work using mostly alveolar epithelial cell lines, Zhou et al reported that prolonged hypoxia could also induce EMT *in vitro* in lung epithelial cells, and that EMT was related to the expression of HIF1- α and to the accumulation of O₂ reactive species (ROS) produced by hypoxic mitochondria, both leading to an increase in

TGF β 1 expression and secretion (7, 44, 57). TGF β 1 is a profibrotic factor overexpressed in the lung during IPF and ALI, which is considered as one of the major inducers of EMT in lung fibrosis (6, 10, 20, 21, 53). TGF β 1 has complex biological effects, through both canonical and noncanonical cellular pathways, that can induce SMAD, AKT, ERK and MAPK signalling pathways leading to EMT (24). Here, in hypoxic rat primary AEC, we observed an increase in HIF1- α and in TGF β -1 expression and secretion in apical medium, consistent with previous findings of Zhou et al (57). The concentration of active TGF β 1 in apical supernatant of AEC was relatively low, around 50pg/ml. However, Zhou et al demonstrated that such concentrations of active TGF β 1 secreted by AEC under hypoxic condition were able to induce EMT via an autocrine way inasmuch as blockade of TGF β 1 type I receptor kinase by SB431542 prevented the hypoxia-induced EMT in these cells (57). Indeed, in the present study, incubation of hypoxic AEC with SB431542 suppressed the hypoxia-induced increase in mRNA transcripts encoding TWIST1 and CTGF and prevented the decrease in TTF-1 protein expression, supporting the major role of TGF β 1 in our model.

In our experiments, the expression of HIF1- α and of HIF2- α proteins was transient (disappearing after 48 hours), an observation previously reported for of HIF1- α in A549 cells (52). Hypoxia also induced the expression of transcription factors classically involved in EMT such as SNAIL1 first, ZEB1 and TWIST1 with a specific time-course (24). Although *snail* is a target gene for HIF (30), the rapid increase in SNAIL1 protein observed after only 2h without any change in SNAIL1 mRNA levels suggest a post-translational regulation of SNAIL1 protein under hypoxic condition. ZEB1 mRNA up-regulation observed at 24h of hypoxia is consistent with SNAIL1 directly targeting the *ZEB1* gene, although ZEB1 expression can also be induced by TGF β 1 (24). However, we could not evidence any increase in ZEB1 protein expression under hypoxia, suggesting that either ZEB1 mRNA up-regulation was not followed by translation of the protein, or that ZEB1 protein was rapidly degraded under hypoxia. ZEB1 is a short-lived protein (half-life is less than 1 h), expressed at very low levels in epithelial cells and targeted by the ubiquitin proteasome system, which makes it difficult to study (24). The increase in TWIST1 mRNA transcripts at 48h of hypoxia could either be due to a direct transcriptional

effect of HIF1- α or to an indirect up-regulation by TGF β 1 (8, 55). Finally, hypoxia induced the up-regulation (at both mRNA and protein levels) of CTGF, a target of HIF1- α and TGF β 1 previously shown to favour EMT (3, 16, 45, 48).

The most important finding of our study is that hMSCs could prevent hypoxia-induced phenotypic changes evoking EMT in AEC, at least *in vitro*. This protective effect was reproduced by hMSC-CM, consistent with a paracrine mechanism. Importantly, prolonged exposure to hypoxia did not alter the phenotype of hMSCs, which is consistent with the fact that hMSCs are physiologically exposed in the bone marrow to low O₂ concentrations, ranging from 1% to 7% O₂ (9). The fact that when submitted to hypoxia hMSCs did not transform themselves into fibroblasts or myofibroblasts (at least *in vitro*) is of course a prerequisite for the future therapeutic use of these cells in the context of ALI or lung fibrosis. Co-culture with hMSC completely blunted the up-regulation of some transcription factors driving EMT such as ZEB1 and TWIST1. It also suppressed the induction of TGF β 1 mRNAs as well as the apical secretion of active TGF β 1 induced by hypoxia, and blunted the up-regulation of CTGF. The decrease in TGF β 1 secretion induced by hMSC is certainly a crucial point since autocrine activation of hypoxic AEC by TGF β 1 can lead to the expression of EMT-driving transcription factors as well and of the EMT inducer CTGF (3, 8, 24).

Several *ex vivo* and *in vitro* studies from our group and other groups have evidenced the involvement of KGF in the beneficial effects of hMSC on injured AEC, namely on transepithelial alveolar sodium transport and alveolar fluid clearance (12, 25, 27). Also, the protective effect of KGF on AEC has been widely demonstrated *in vitro* and in several models of lung injury in rodents and more recently in the human lung (13, 39, 40, 43, 47). Consistent with these observations, the current study shows that incubation of hypoxic AEC with low concentrations of rhKGF reproduced the effects of co-culture with hMSC on TTF-1, TGF β 1, TWIST1 and CTGF. Furthermore, incubation of AEC with hMSC-CM depleted in KGF failed to prevent the hypoxia-induced increase in TWIST1 mRNA transcript, whereas complete hMSC-CM containing KGF did. Interestingly, Pereira et al. previously reported that gene transfer of KGF in the skin reduced the expression of TGF β and improved wound healing through a mechanism still unknown (37). Here, we can speculate that KGF, via the

activation of Nrf2 transcription factor, could up-regulate antioxidant responses and reduce ROS accumulation in hypoxic AEC, which in turn could decrease TGF β 1 expression (4, 32, 57). Finally, other paracrine factors distinct from KGF may also contribute to the beneficial effect of hMSC inasmuch as, unlike co-culture with hMSC, incubation with rhKGF was unable to suppress the increase in ZEB1 mRNA transcripts observed in hypoxic AEC.

In conclusion, the present study shows that hMSCs prevent alveolar EMT induced by hypoxia *in vitro* by down-regulating the expression of TGF β 1 and CTGF and the activation of transcription factors driving EMT, and that this beneficial effect could be due at least in part to the release of KGF. Our study therefore identifies a novel mechanism of action of hMSCs on AEC that could contribute to the beneficial effects of hMSC administration evidenced in animal models of acute or chronic lung injuries. This protective role of hMSCs may be of particular importance in the perspective of cell therapies using hMSC in patients because alveolar hypoxia is frequently encountered during ALI or during acute exacerbation of IPF, and because alterations of AEC phenotype might compromise alveolar repair and promote lung fibrosis.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms Patricia Quidu and Dr Erwan Guyot for helpful technical assistance, and Pr Nathalie Charnaux for fruitful discussions.

Grants

This work was supported by Legs Poix from Chancellerie des Universités de Paris, by University Paris 13, and by Sorbonne Paris Cité. Yurdagül Uzunhan was the recipient of a Collège des Enseignants de Pneumologie fellowship, and of a Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire fellowship.

Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

1. **Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, and Larghero J.** Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21: 158-163, 2007.
2. **Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, and Kourembanas S.** Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1122-1130, 2009.
3. **Black SA Jr, Trackman PC.** Transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) stimulates connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) expression in human gingival fibroblasts through a RhoA-independent, Rac1/Cdc42-dependent mechanism: statins with forskolin block TGFbeta1-induced CCN2/CTGF expression. *J Biol Chem* 283(16):10835-47, 2008.
4. **Braun S, hanelmann C, gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, and Werner S.** Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action that regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 22(5):5492-5505, 2002.
5. **Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G.** Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 20: 1053-1067, 2009.
6. **Burnham EL, Janssen WJ, Riches DWH, Moss M, Downey GP.** The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur Respir J* 43: 276-285, 2014.
7. **Chandel NS.** Mitochondrial complex III: An essential component of universal oxygen sensing machinery? *Respir Physiol & Neurobiol* 174(3):175-81, 2010.
8. **Cho KH, Jeong KJ, Shin SC, Kang J, Park GG, Lee HY.** STAT3 mediates TGF- β 1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion. *Cancer Lett* 336: 167-73, 2013.

9. **Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Gully C, Gassner R, and Lepperdinger G.** Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6: 745-757, 2007.
10. **Felton VM, Borok Z, Willis BC.** N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(5): L805-12, 2009.
11. **Frank JA, Pittet JF, Wray C, and Matthay MA.** Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax* 63: 147-153, 2008.
12. **Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C.** Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306(11): L975-85, 2014.
13. **Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, and Nelson S.** Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155: 1777-1784, 1997.
14. **Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, and Matthay MA.** Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 179: 1855-1863, 2007.
15. **Haase VH.** Pathophysiological consequences of HIF activation. HIF as a modulator of fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1177:57-65, 2009.
16. **Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH.** Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1223-F1232, 2004.
17. **Higgins DF, Kimura K, Bernardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt K-U, Iwano M, Haase**

- VH.** Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-3820, 2007.
18. **Ionescu L, Byrne RN, van Haften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Weissmann G, Hall A, Eaton F, and Thebaud B.** Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L967-977, 2012.
 19. **Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J.** Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med* 18(5):759-65, 2012.
 20. **Jain R, Shaul PW, Borok Z and Willis BC.** Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF- β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:38-47, 2007.
 21. **Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D and Chapman HA.** Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Nat Acad Sci USA* 103:13180-13185, 2006.
 22. **King TE, Pardo A, Selman M.** Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949-1961, 2011.
 23. **Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, Zhuo H, Su X, Lee JW, Gupta N, Petrini M, Matthay MA.** Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302(10): L1003-13, 2012.
 24. **Lamouille S, Xu J, Derynck R.** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178-196, 2014.
 25. **Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, and Matthay MA.** Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16357-16362, 2009.

26. **Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, and Matthay MA.** Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* 29: 913-919, 2011.
27. **Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, Song Y, Abbott J, and Matthay MA.** Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cells In Ex Vivo Human Lungs Injured with Live Bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 187(7):751-60, 2013.
28. **Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, and Prockop DJ.** Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5:54-63, 2009.
29. **Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, and Prockop DJ.** Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17438-17443, 2006.
30. **Luo D, Wang J, Li J, Post M.** Mouse Snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res* 9:234-45, 2011.
31. **Matthay MA, Ware LB, and Zimmerman GA.** The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 122: 2731-2740, 2012.
32. **Michaeloudes C, Chang P-J, Petrou M and Chung KF.** Transforming growth factor b and nuclear factor E2-related factor 2 regulate antioxidant responses in airway smooth muscle cells. Role in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 184:894-903, 2011.
33. **Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, and Mezey E.** Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42-49, 2009.
34. **Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, and Phinney DG.** Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and

- antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11002-11007, 2007.
35. **Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, and Phinney DG.** Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8407-8411, 2003.
 36. **Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, and Mason RJ.** Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92:969-977, 1993.
 37. **Pereira CT, Herndon DN, Rocker R, and Jeschke MG.** Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression. *J Surg Res* 139:222-228, 2007.
 38. **Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, and Clerici C.** Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 47318-47324, 2002.
 39. **Qiao R, Yan W, Clavijo C, Mehrian-Shai R, Zhong Q, Kim KJ, Ann D, Crandall ED, Borok Z.** Effects of KGF on alveolar epithelial cell transdifferentiation are mediated by JNK signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(2):239-46, 2008.
 40. **Ray P.** Protection of Epithelial Cells by Keratinocyte Growth Factor Signaling. *Proc Am Thorac Soc* 2:221–225, 2005.
 41. **Rock JR, Barkauskas CE, Cronce MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW and Hogan LM.** Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(52):E1475-E1483, 2011.
 42. **Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, and Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 145-152, 2005.

43. **Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K.** Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(3):489-97, 2011.
44. **Semenza GL.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *N Engl J Med* 365:537-47, 2011.
45. **Shafieian M, Chen S, Wu S.** Integrin-linked kinase mediates CTGF-induced epithelial to mesenchymal transition in alveolar type II epithelial cells. *Pediatr Res* 77(4):520-7, 2015.
46. **Shin HW, Cho K, Kim DW, Han DH, Khalmuratova R, Kim SW, Jeon SY, Min YG, Lee CH, Rhee CS, Park JW.** Hypoxia-inducible factor 1 mediates nasal polyposis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Respir Crit Care Med* 185(9): 944-54, 2012.
47. **Shyamsundar M, McAuley DF, Ingram RJ, Gibson DS, O'Kane D, McKeown ST, Edwards A, Taggart C, Elborn JS, Calfee CS, Matthay MA, O'Kane CM.** Keratinocyte growth factor promotes epithelial survival and resolution in a human model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 189(12): 1520-9, 2014.
48. **Sonnlyal S, Xu S, Jones H, Tam A, Sreeram VR, Ponticos M, Norman J, Agrawal P, Abraham D, de Crombrughe B.** Connective tissue growth factor causes EMT-like cell fate changes in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 126:2164-75, 2013.
49. **Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS and Lawson WE.** Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 180(7):657-665, 2009.
50. **Thiery JP and Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142, 2006.
51. **Tzouvelekis A, Harokopos V, Pappas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, Tsiambias E, Karameris A, Bouros D, Aidinis V.** Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of Hypoxia-Inducible

Factor-1 α in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1108-1119, 2007.

52. **Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C.** Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha and HIF-2 alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 alpha. *J Biol Chem* 279: 14871-8, 2004.
53. **Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z.** Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by Transforming Growth Factor- β_1 . Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1321-1332, 2005.
54. **Wang Y, Folkesson HG, Jayr C, Ware LB, and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl Physiol* 87: 1852-1860, 1999.
55. **Yang M-H, Wu K-J.** TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). Implications in metastasis and development. *Cell Cycle* 7: 2090-96, 2008.
56. **Zeisberg M, Neilson EG.** Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429-37, 2009.
57. **Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI.** Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L1120-L1130, 2010.

Figure legends

Figure 1: Experimental protocol and characterization of rat primary alveolar epithelial cells. A. At day 0, rat AEC were isolated and seeded on semi-permeable filters, and hMSC (passage n, with $2 \leq n \leq 5$) were seeded on plastic dishes. At day 1 (24h after AEC isolation), rat AEC on filters cultured alone or co-cultured with hMSC (bottom of the wells) were exposed to either normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for up to 12 days. Note that for 12-day co-cultures, hMSC were replaced after 6 days of exposure by “fresh” hMSC from the same donor (passage n+1), seeded at the same density as for day 0. B. Representative gel showing the expression of surfactant protein A (*sftpa1*), B (*sftpb*) and C (*sftpc*) mRNA transcripts by RT-PCR at day 0, 1, 3 and 6 in primary rat AEC grown under normoxic condition. C. Expression of AQP5 protein by Western blot at day 1, 3 and 6 in primary rat AEC grown under normoxic condition.

Figure 2: Effects of hypoxia on alveolar epithelial cell phenotype. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers were exposed to a normoxic (21% O₂) (gray bars) or a hypoxic (1.5% O₂) (black bars) atmosphere for 6 or 12 days. A: Representative immunostainings of E-Cadherin (red) (first column), ZO-1 (green) and TTF-1 (red) (second column), ZO-1 (red) and vimentin (green) (third column), ZO-1 (red) and α -SMA (green) (fourth column) after 6 days of exposure (original magnification X 400). Nuclei were stained with DAPI (blue) except for ZO-1/TTF-1 stainings. B: Representative immunoblots showing the expression of E-cadherin, TTF-1 and AQP-5 in AEC. The intracellular protein β -actin was used as a loading control. Densitometric signals were normalized for the corresponding β -actin signal (n=10 separate experiments for E-Cadherin, n=3 for AQP-5, n=7 for TTF-1). C: Representative immunostainings of ZO-1 (green) and TTF-1 (red) (first column), vimentin (green) (second column) and α -SMA (green) (third column) after 12 days of normoxic or hypoxic exposure (original magnification X 400). Nuclei were stained with DAPI (blue) except for ZO-1/TTF-1 stainings. D: Representative immunoblots showing the expression of E-cadherin, TTF-1, vimentin, α -SMA and β -actin in normoxic/hypoxic AEC. Densitometric signals normalized for the corresponding β -actin signal (n=4-5 separate experiments). Statistical significance was calculated

from the raw data by paired *t* test. *, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). NS: not significant.

Figure 3: Effect of hypoxia on human mesenchymal stem cell phenotype. Human MSC grown on plastic were exposed for 6 days to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂), either alone or in co-culture with rat AEC. A: Morphological appearance of hMSC by light microscopy (hematoxylin staining; original magnification X 100). B: Expression of hMSC surface markers by flow cytometry (n=3 separate experiments). C: Representative immunoblots showing the expression of α -SMA, vimentin and β -actin.

Figure 4: Effect of co-culture with hMSC on hypoxia-induced alterations of alveolar epithelial cell phenotype. At day 1 after isolation, rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for 6 or 12 days. In some experiments, AEC were incubated with hMSC conditioned media (hMSC-CM) throughout hypoxic exposure. A: Transepithelial electric resistance (R_{te}) values across AEC monolayers after 6 days of exposure (n=13 filters per condition from 6 independent experiments). B: Representative immunostainings of E-cadherin (nuclei stained with DAPI), and ZO-1 (green) and TTF-1 (red) in AEC monolayers after a 6-day exposure (original magnification X 400). C: Representative immunoblots showing the expression TTF-1 and β -actin. Densitometric signal for TTF-1 normalized for the corresponding β -actin signal (n=5 separate experiments). D: Transepithelial electric resistance values after a 12-day exposure (n=15 filters per condition from 9 independent experiments). E: Representative immunostainings of ZO-1 (green) and TTF-1 (red) in AEC monolayers after a 12-day exposure (original magnification X 400). F: Representative immunoblots showing the expression TTF-1, E-Cadherin (E-cadh), Vimentin (Vim) and β -actin, and densitometric signals normalized for the corresponding β -actin signal (n=4-6 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by one-way ANOVA. *, **, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) and #: significantly different from hypoxic value ($p < 0.05$). NS: not significant.

Figure 5: Effect of hMSCs on Hypoxia-Inducible Factor expression in alveolar epithelial cells. Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for various exposure times (2h, 3h, 24h or 48h) as indicated. A and B: expression of HIF1- α , HIF2- α and β -actin in AEC exposed to normoxia (gray bars) or hypoxia for 2 and 3 h in the absence (black bars) or presence (hatched bars) of hMSC co-culture (representative immunoblots in panel A, densitometric quantification of HIF1- α normalized for β -actin signal in panel B). C and D: expression of HIF1- α and β -actin in AEC exposed to normoxia or hypoxia for 24 and 48 h in the absence or presence of hMSC co-culture (representative immunoblot in panel C, densitometric quantification at 24h in panel D). E and F: expression of HIF2- α and β -actin in AEC exposed to normoxia or hypoxia for 24 and 48 h in the absence or presence of hMSC co-culture (representative immunoblot in panel E, densitometric quantification at 24h in panel F). Results represent means \pm SE (n=4-5 separate experiments). Statistical significance was calculated from the raw data by one-way ANOVA. *, **, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively).

Figure 6: Effect of hMSC on transcription factors involved in hypoxia-induced EMT in alveolar epithelial cells. Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for various exposure times (2h to 48h) as indicated. A: Time-course of the expression of SNAIL1 mRNA transcripts as assessed by qRT-PCR (n=3); B: Representative immunoblots showing the expression of SNAIL1 and β -actin in AEC after 2 and 3h of exposure, and densitometric quantification of SNAIL-1 signal normalized for the corresponding β -actin signal (n=3). C: Relative expression of ZEB1 mRNA transcripts in AEC at 24h as assessed by qRT-PCR (n=5-11). D: Relative expression of TWIST1 mRNA transcripts in AEC at 48h (n=5-9). *, ***: significantly different from normoxic value ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) and ##: significantly different from hypoxic value ($p < 0.01$) (one-way ANOVA).

Figure 7: Effect of hMSC on profibrotic factor expression in alveolar epithelial cells. A: Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars), or exposed to hypoxia (1.5% O₂) either alone (black bars) or in co-culture with hMSCs at the bottom of the wells (hatched bars) for 24h or 48h exposure times as indicated, and relative expression of TGFβ1 mRNA transcripts in AEC at 24h was assessed by qRT-PCR (n=4-10). B: Concentration of free TGFβ1 in apical medium of AEC at 24h as assessed by ELISA (n=3). C: Relative expression of CTGF mRNA transcripts in AEC at 48h (n=4-9). D: Representative immunoblots showing the expression of CTGF and β-actin in AEC after 24 and 48h of hypoxic exposure (experiments were repeated twice with similar results). E to G: rat AEC were exposed for 48h (E-F) or 6 days (G) to normoxia or hypoxia in the absence or presence of 10μM SB431542 (SB), an inhibitor of ALK5, a TGFβ1 type I receptor kinase. TWIST1 (E) and CTGF (F) mRNA transcripts were quantified at 48h (n=4-5), and immunostaining of TTF-1 (green) was performed after 6 days (G) (n=3). **, ***: significantly different from normoxic value ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) and ##, ###: significantly different from hypoxic value ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) (one-way ANOVA).

Figure 8: Effect of KGF on hypoxia-induced EMT in alveolar epithelial cells. A: Rat AEC monolayers on transwell filters were maintained in normoxia (21% O₂) (gray bars) or exposed to hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the absence (black bars) or in the presence of increasing concentrations of rhKGF (final concentration in culture medium: 125, 250 or 500 pg/ml) (hatched bars) as indicated and relative expression of TGFβ1 mRNA transcripts was assessed by qRT-PCR (n=3-5). B and C: Relative expression of TWIST1 mRNA transcripts (n=4-9) and of CTGF mRNA transcripts in AEC at 48h (n=4-9) in the absence or presence of rhKGF (250 pg/ml). D. Representative immunoblots showing the expression TTF-1 and β-actin after a 6 day-exposure to normoxia or hypoxia in the absence or presence of rhKGF (250 pg/ml). Densitometric quantification of TTF-1 signal normalized for the corresponding β-actin signal (n=4). E: Relative expression at 48h of TWIST1 mRNA transcripts in hypoxic AEC treated with hMSC-CM depleted in KGF (hMSC-CM + anti-KGF) or not depleted (hMSC-CM + IgG) (n=3). **, ***: significantly different from normoxic value ($p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) (one-way ANOVA). #, ##, ###: significantly different from hypoxic value ($p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively).

Table 1. Sequence and length of primers used for quantitative real-time PCR

Sequence name (bp)	Forward primer	Reverse primer
SNAIL1 (120)	GCTCCTCACTGCCAGGATTC	CTGCCTTCCATCAGCCATCT
SNAIL2 (90)	CATTAGAACACACACTGGGGA AA	TGCAGATGTGCCCTCAGGTT
ZEB1 (90)	CCGTAAGTTCAAGTGCACCG	GTGGGACTGCCACTGTGGAT
TWIST1 (108)	CTACGCCTTCTCCGTCTGGA	CAATGACATCTAGGTCTCCGGC
CTGF (100)	CCTAGCTGCCTACCGACTGG	CTTAGAACAGGCGCTCCACT
TGFβ1 (146)	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	TGGGACTGATCCCATTGATT
β-actin (74)	ACCGTGAAAAGATGACCCAG A	CACAGCCTGGATGGCTACGT
SPA (135)	CCTGGAGAACGTGGAGACAA	GCTGAGGACTCCCATTGTTTG
SPB (76)	TGATTCCAAGGGTGTGCTG	CAGATGCCACCCACCACC
SPC (92)	ATGGAGAGCCCACCGGATTA	ACCACGATGAGAAGGCGTTT

Fig 1

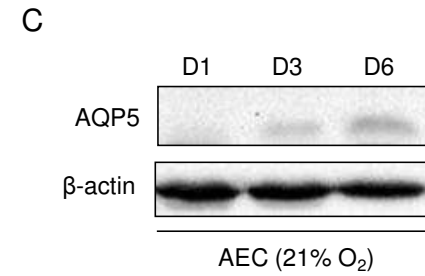
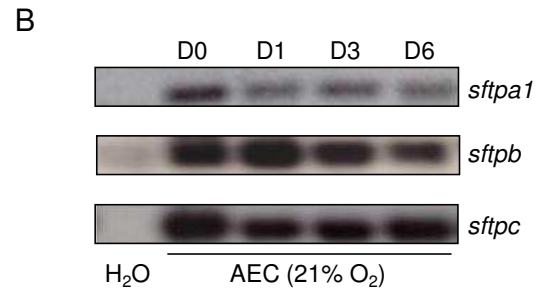
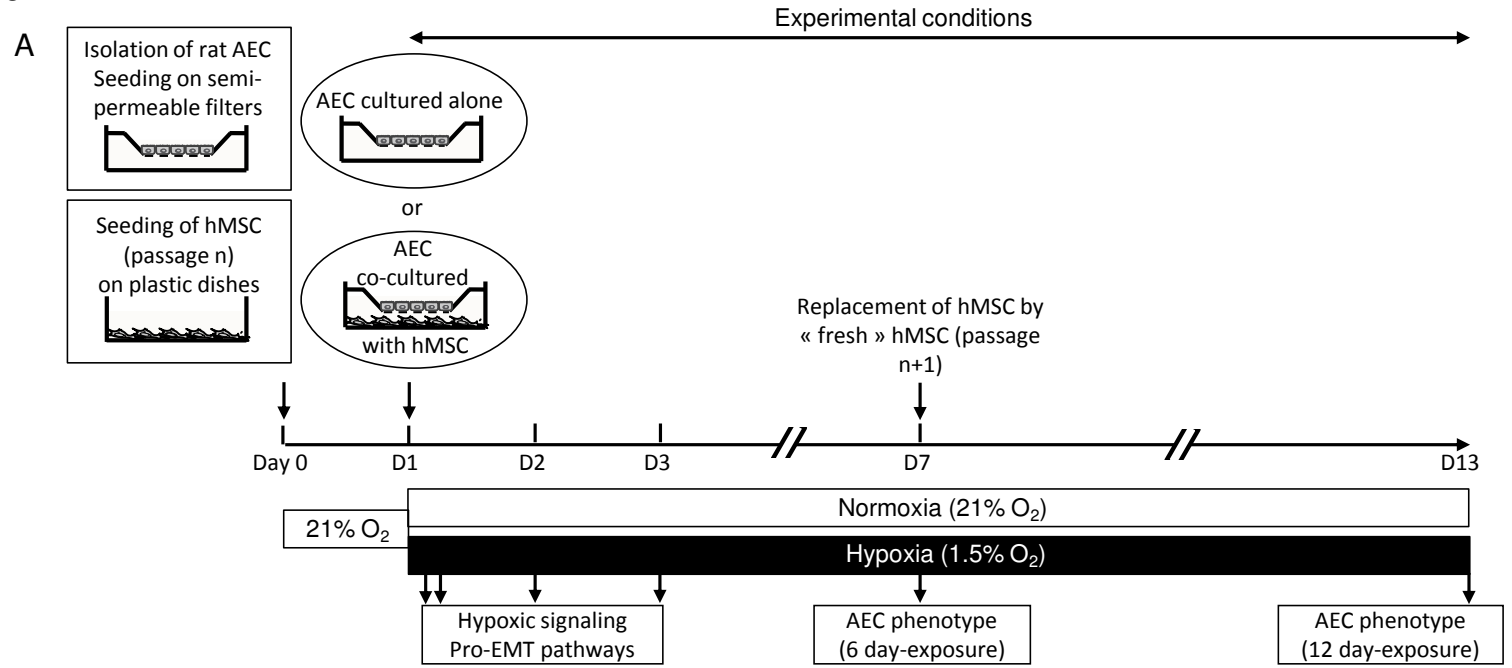


Fig 2

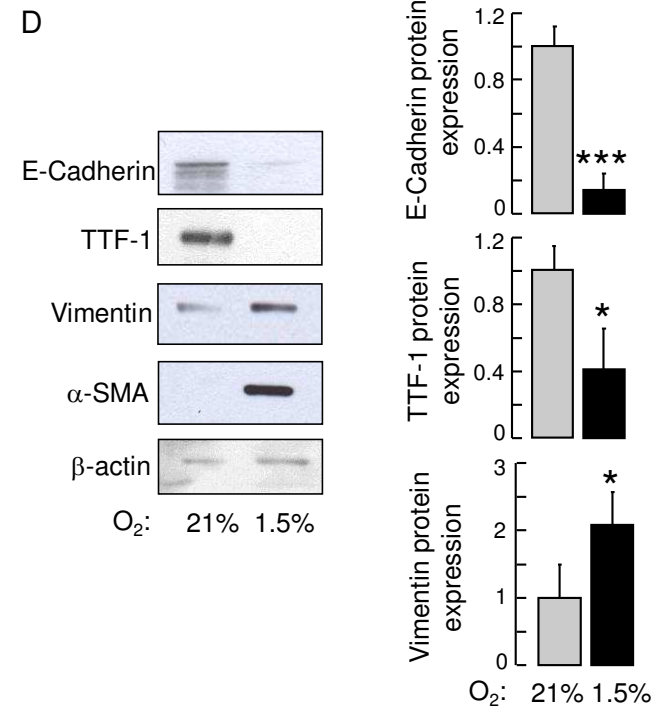
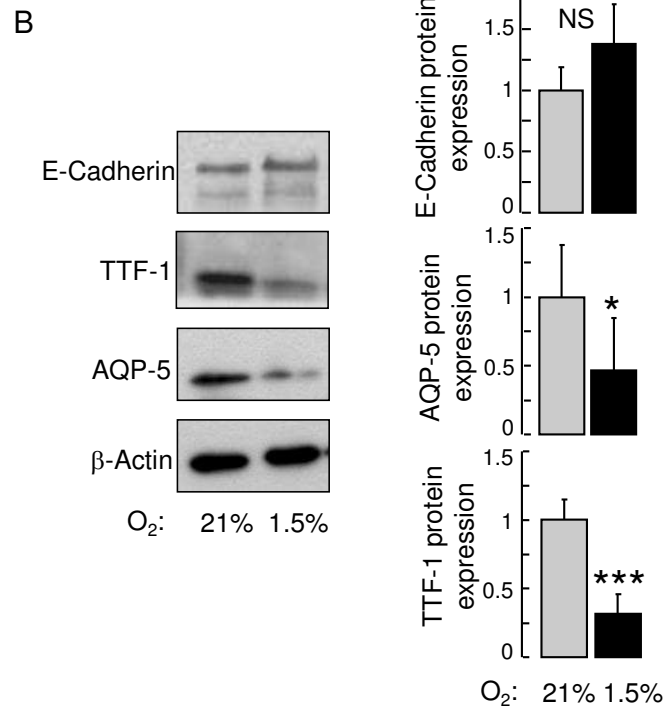
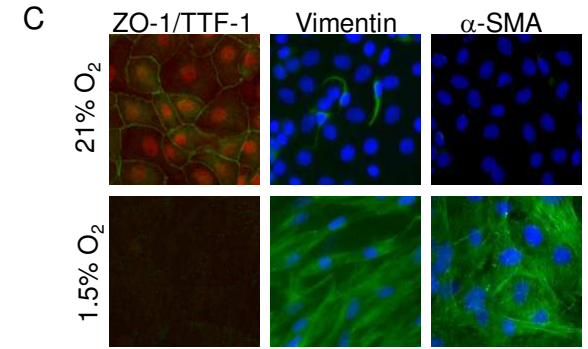
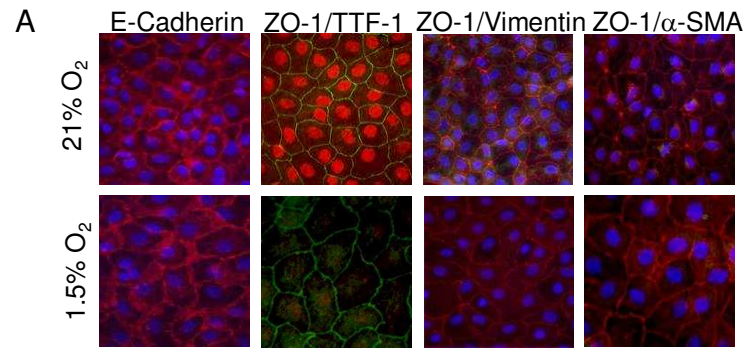
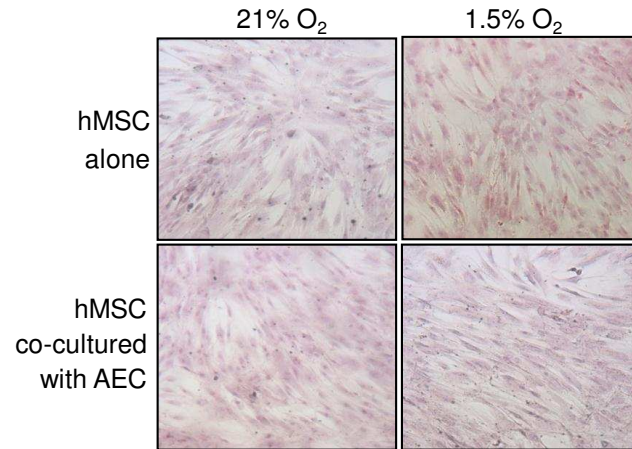
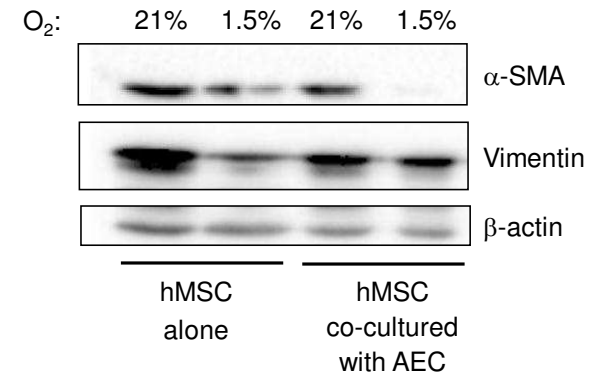


Fig 3

A



C



B

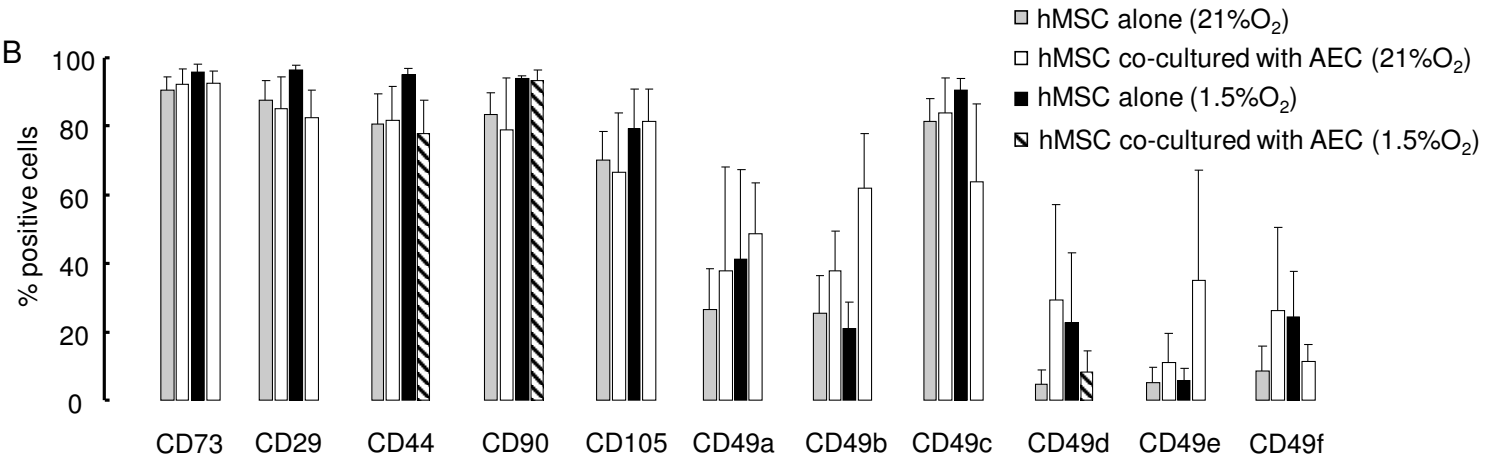


Fig 4

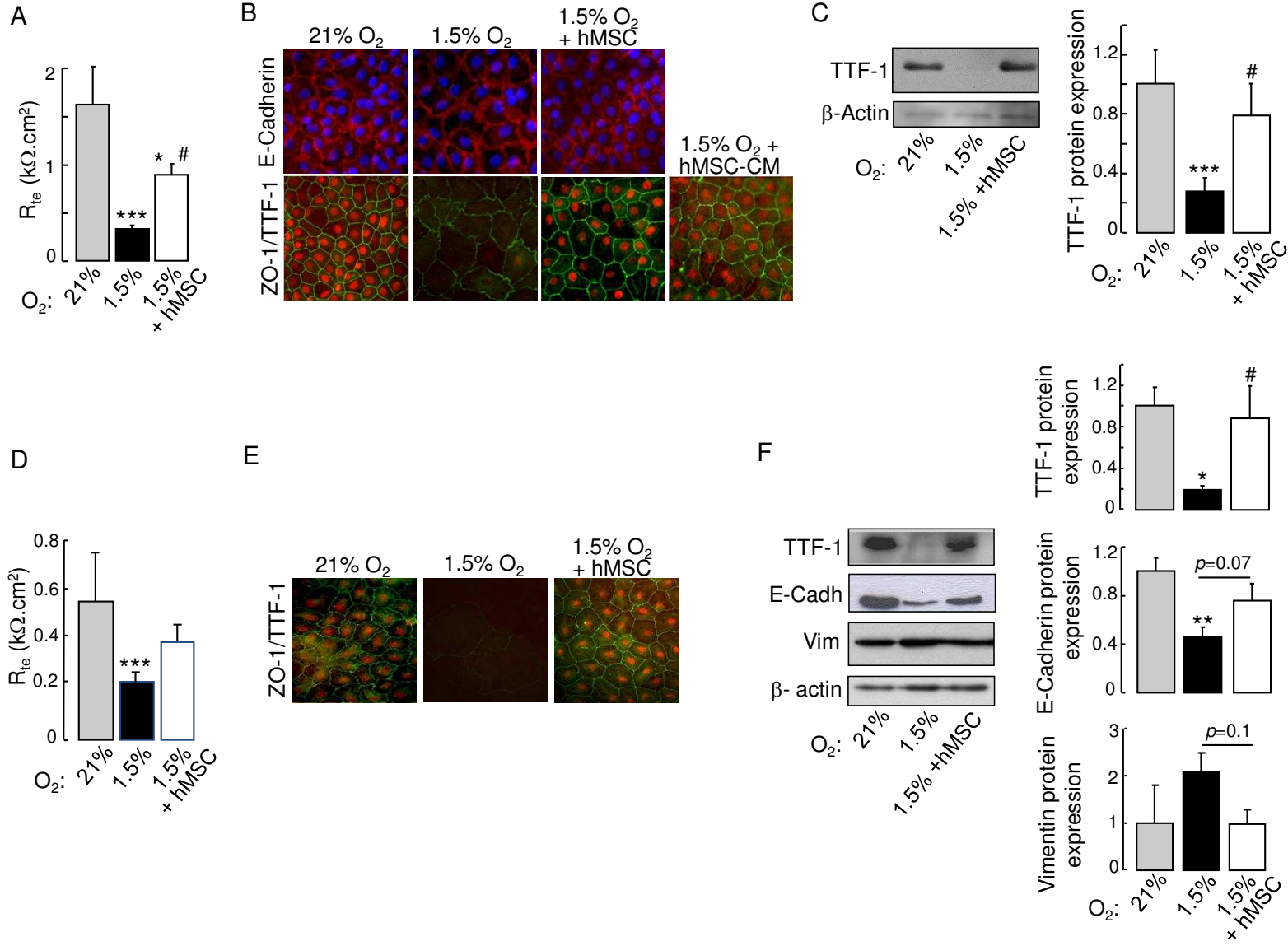


Fig 5

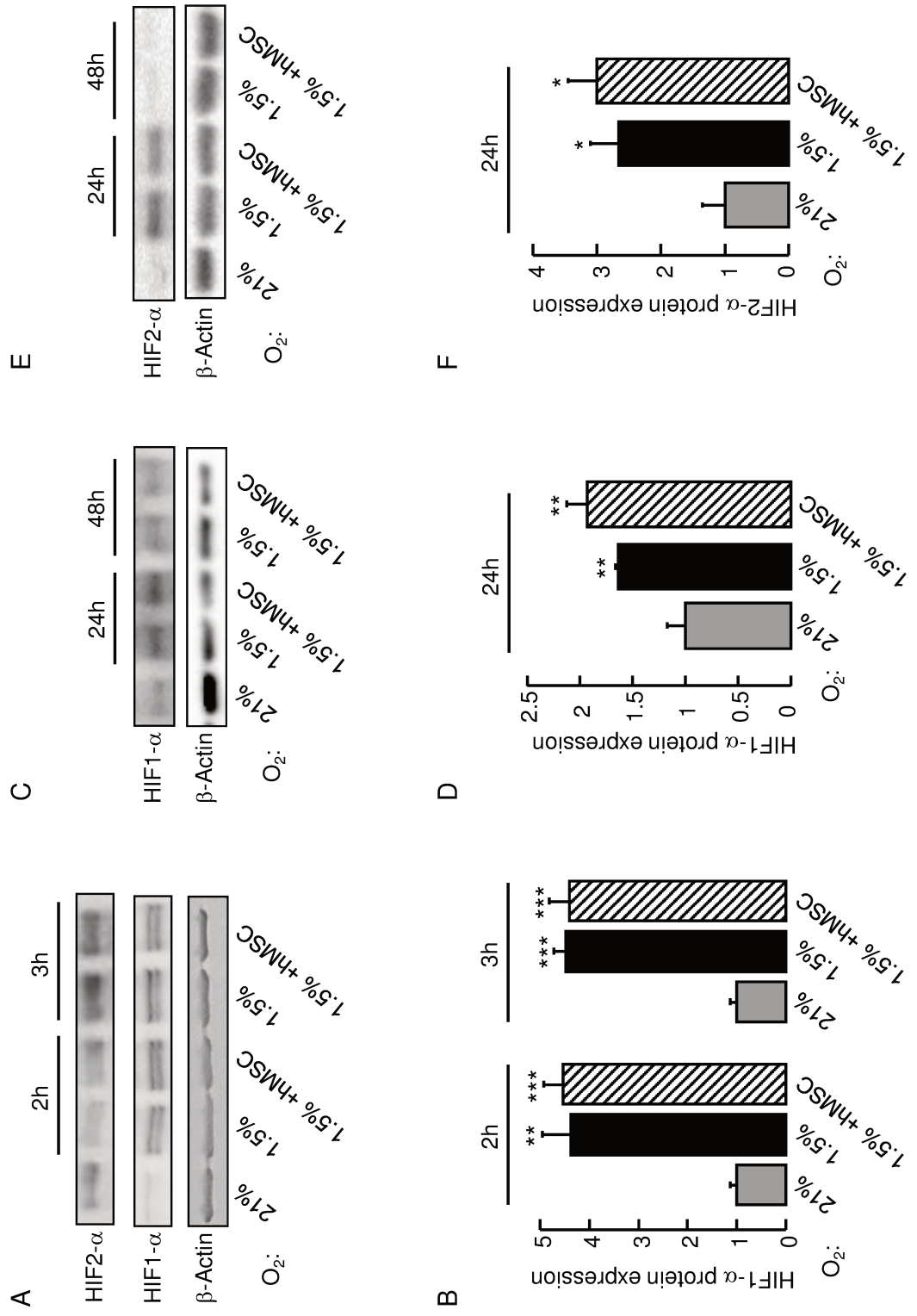


Fig 6

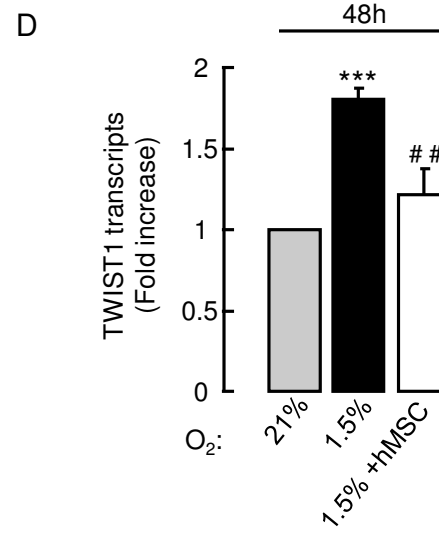
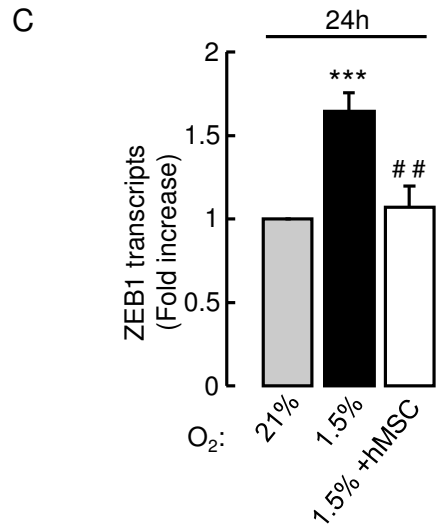
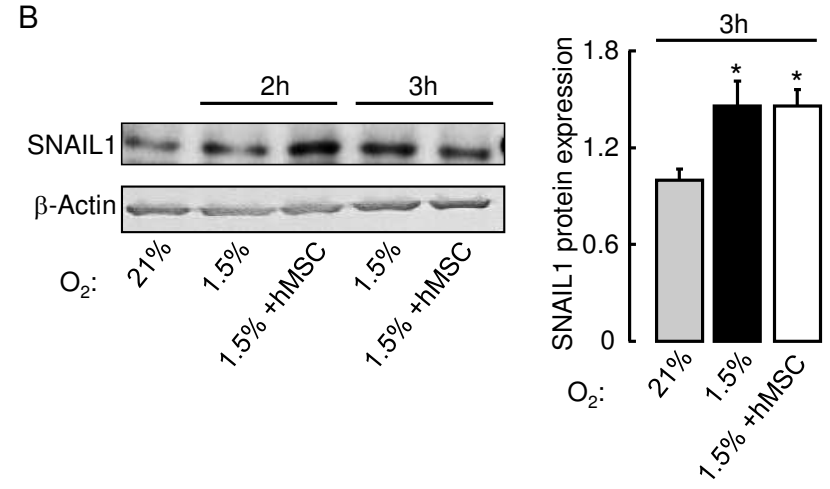
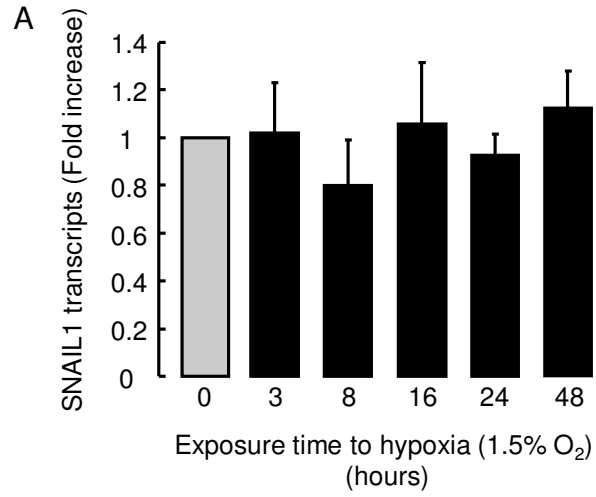


Fig 7

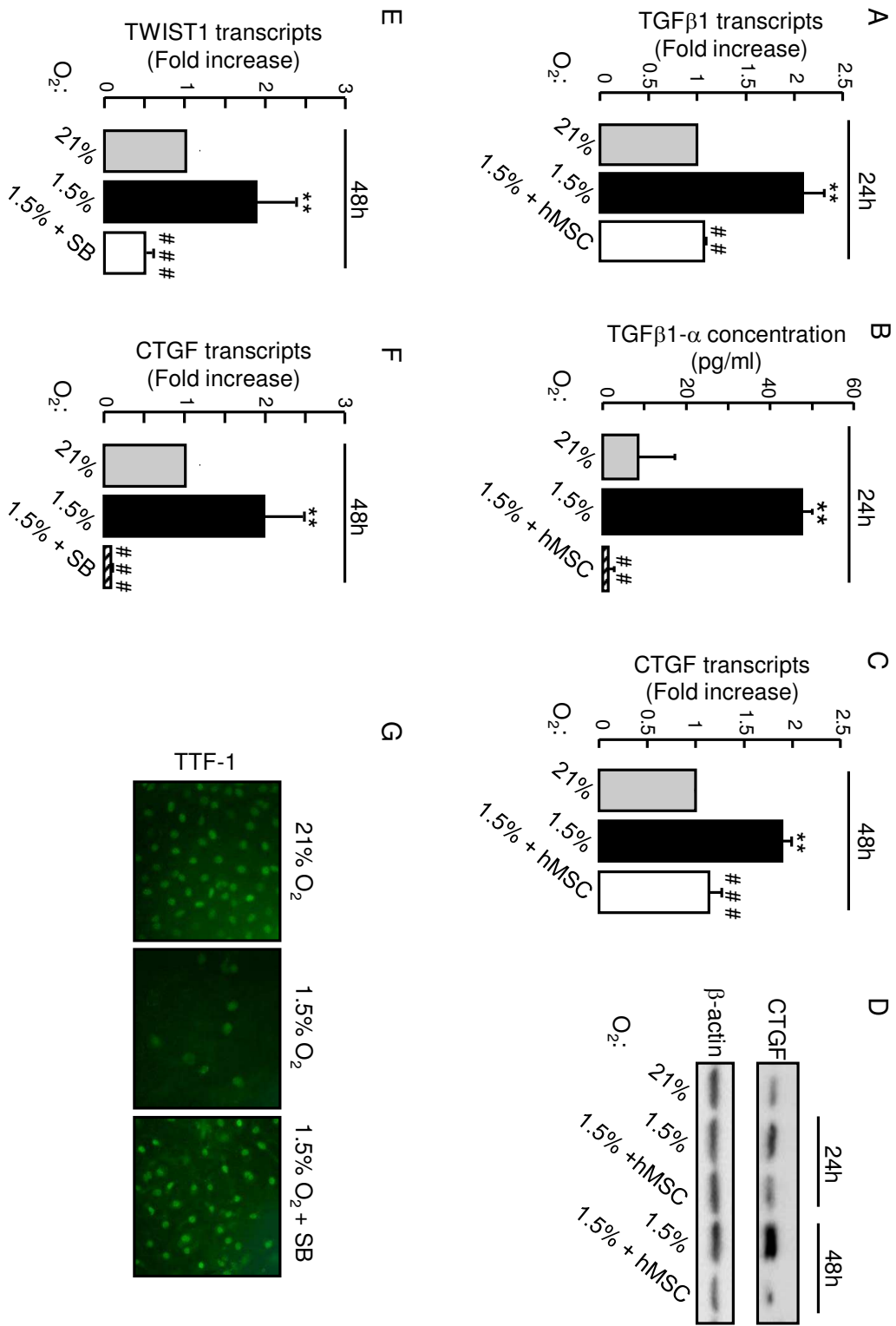
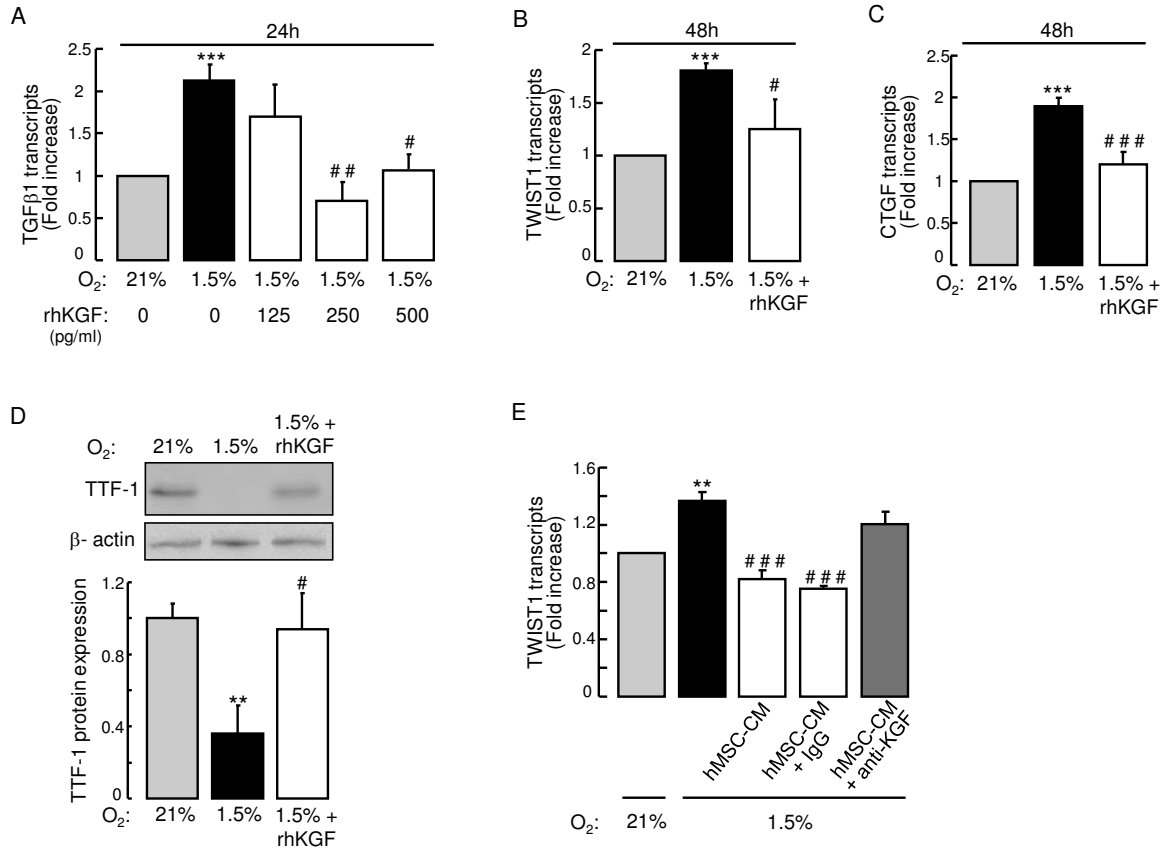


Fig 8



6.2. Schéma de l'étude

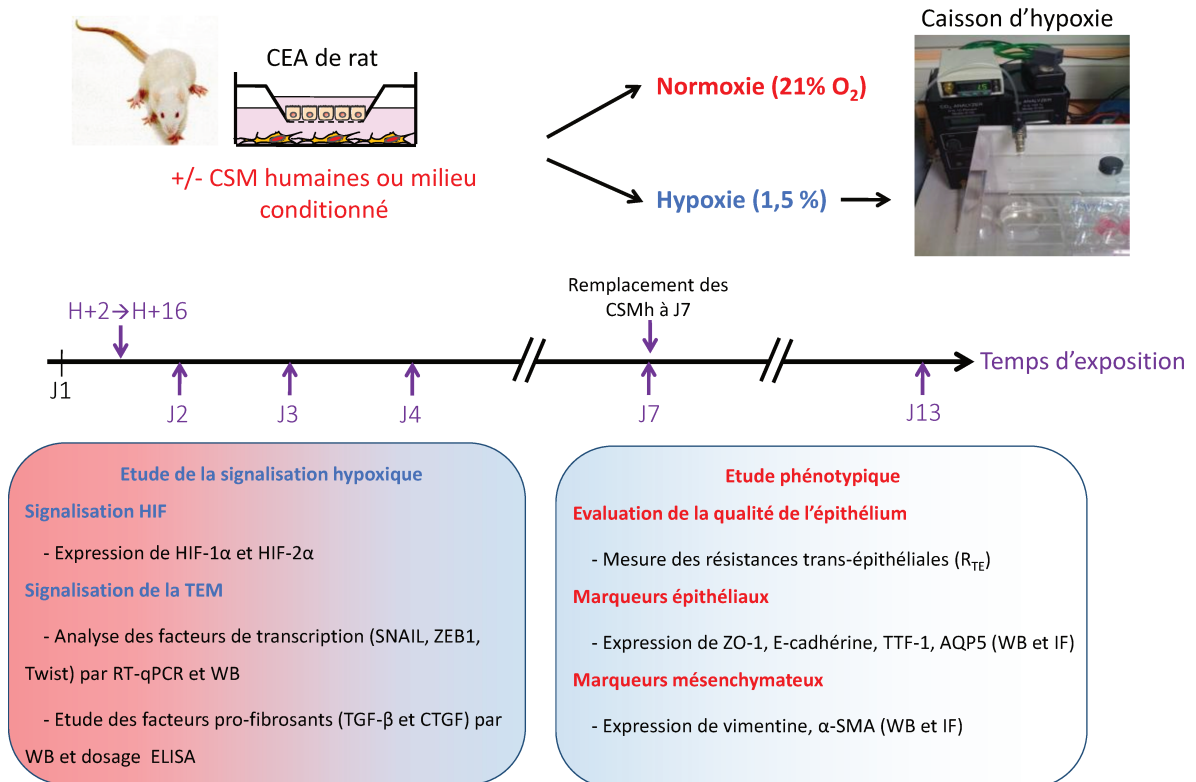


Fig 33. Schéma du protocole de l'étude 1

6.3. Résumé des résultats

Ce travail a permis de mettre en évidence les modifications phénotypiques des cellules épithéliales alvéolaires soumises à une hypoxie chronique, ainsi que l'effet préventif des cellules souches mésenchymateuses dans un modèle de co-culture in vitro sans contact, afin d'étudier les effets paracrines mis en jeu.

Lorsque les CEA sont en situation d'hypoxie, on observe une stabilisation rapide des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α , ainsi que la transcription et l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la TEM, à savoir SNAIL, TWIST1 et ZEB1. De plus, on constate l'augmentation de l'expression et/ou la sécrétion de médiateurs pro-fibrosants tels que le TGF- β 1 et le CTGF, connus pour induire la TEM. Des modifications phénotypiques importantes surviennent lorsque l'hypoxie devient chronique (entre 6 et 12 jours). Les résistances trans-épithéliales (R_{TE}) diminuent, signifiant la perte de l'étanchéité de l'épithélium formé in vitro. La perte progressive d'expression des marqueurs épithéliaux (TTF1, AQP5, ZO-1 et E-cadhérine) est couplée à l'apparition, elle-même progressive, de marqueurs mésenchymateux (α -SMA et vimentine) observée en immunofluorescence et quantifiée en western blot.

Ces modifications phénotypiques sont prévenues tout ou partie par la co-culture avec les CSM humaines. L'expression des médiateurs pro-fibrosants TGF- β et CTGF et des facteurs de transcription pro-TEM ZEB1 et TWIST1 sont réduites. SNAIL n'est cependant pas modulé dans les CEA par la co-culture en présence de CSM. L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur du TGF- β rétablit l'expression de TTF1 après 6 jours d'hypoxie, et inhibe la transcription de CTGF et de TWIST1. Le recombinant humain du keratinocyte growth factor (rhKGF) à une concentration équivalente à celle retrouvée dans le milieu conditionné des CSM permet de réprimer l'expression du TGF- β 1 et de ses cibles TWIST1 et CTGF dans les CEA hypoxiques. Le milieu conditionné déplété en KGF n'est pas capable d'induire la diminution de la transcription de TWIST1 en hypoxie.

Ainsi, les CSM humaines permettent de protéger les CEA contre les modifications phénotypiques évocatrices de TEM en hypoxie chronique, par un mécanisme inhibant la voie du TGF- β 1 probablement dû en partie à la sécrétion de KGF par les CSM.

6.4. Discussion

6.4.1. Critique et limite du modèle utilisé

Lors de ces travaux, les CEA en culture ont été soumises à un environnement hypoxique fixé à 1.5% d'O₂. Cette valeur correspond à une pression partielle en oxygène dans le milieu de culture de 45 mmHg. Le choix de ce niveau d'hypoxie repose d'une part sur les données de la littérature, où de nombreuses cultures cellulaires ont été réalisées de cette manière. D'autre part, de telles valeurs de PO₂ peuvent vraisemblablement être observées dans les alvéoles pulmonaires des patients au cours des épisodes d'exacerbations aiguës de FPI, mais aussi dans d'autres atteintes du parenchyme pulmonaire tel que le SDRA.

Une limite importante de ce travail est l'utilisation en co-culture de CEA de rats avec des CSM humaines. L'utilisation de ces dernières était justifiée par le fait que ce seront des CSM humaines qui seront potentiellement utilisées dans les essais de thérapie cellulaire chez les patients atteints de SDRA ou de FPI. Plusieurs travaux réalisés in vivo ont bien montré le rôle bénéfique de l'administration de CSM humaines dans divers modèles murins d'atteinte pulmonaire ([Ortiz 2003](#), [Rojas 2005](#), [Moodley 2009](#), [Li 2015](#)). Les espèces murines et l'Homme possèdent dans leurs génomes de fortes homologies de séquences, ce qui permet de valider les expériences réalisés chez ces animaux, ainsi que nos modèles in vitro.

Les CSM humaines ont été isolées à partir de dons de moelle osseuse, puis caractérisées et purifiées dans le laboratoire de thérapie cellulaire de l'hôpital St Louis (Paris). Les critères de définition des CSM sont scrupuleusement respectés tout au long de leur culture ([Dominici 2006](#), [Keating 2012](#)). Parmi les principales propriétés des CSM, figurent la faible expression de molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II à leur surface et l'absence d'expression de molécules co-stimulation des lymphocytes T (CD40, CD80 et CD86) permettant leur administration allogénique, faisant d'elles des candidates idéales pour des thérapies innovantes en thérapie cellulaire (pour revue [Weiss 2011](#), [Weiss 2015](#), [Antunes 2014](#)). Nous avons vérifié que les CSM n'adoptaient pas un phénotype de myofibroblastes dans nos cultures en hypoxie, par immunofluorescence (marquage de l' α -SMA et de la vimentine) et par western blot après 6 jours de culture. Ce maintien des caractéristiques phénotypiques est cohérent avec le fait que les CSM évoluent dans la moelle osseuse dans un environnement hypoxique de manière physiologique, avec des niveaux d'oxygène allant de 1 à 7% ([Fehrer 2007](#)).

La culture de CEA primaires isolées de tissu pulmonaire humain aurait été préférable à celle de CEA de rat. Notre laboratoire a pu réaliser des extractions de CEA humaines à partir de poumons de donneurs non retenus pour la transplantation, selon les recommandations de l'agence de la biomédecine. Cependant, malgré le suivi du protocole fourni par le Pr Matthay de l'université de San Francisco, le rendement de l'isolement cellulaire était relativement faible, et la viabilité insuffisante des PII ainsi obtenus n'a pas permis l'étude de la TEM qui demande des temps de culture prolongés. Dans de nombreuses études, la culture de cellules primaires de rats a été utilisée comme substituts des CEA humaines. Les CEA de rat, et plus particulièrement les PII, possèdent, à l'instar des cellules humaines, une faible capacité proliférative à un stade physiologique, la capacité à établir des jonctions intercellulaires et à former un tapis cellulaire en culture, recréant ainsi un épithélium en culture *in vitro*. Ces caractéristiques sont difficiles à retrouver dans des lignées cellulaires. La lignée A549 fréquemment utilisée présente des défauts majeurs, à savoir une capacité de prolifération élevée (temps de doublement de 48h), une capacité moindre à former des jonctions intercellulaires, avec une résistance trans-épithéliale 2-3 fois moins importante que dans des cultures primaires ([Kobayashi 1995](#)), rendant problématique l'étude de la TEM. De plus, les cellules A549 dérivent d'un carcinome bronchiolo-alvéolaire, et leur phénotype cancéreux est peu adapté à l'étude de la TEM dans le contexte de fibrogénèse.

Un des problèmes rencontré lors de cultures primaires est la contamination éventuelle par les fibroblastes pulmonaires lors de l'isolement. Leur présence en grand nombre conduirait à une mauvaise interprétation des résultats impliquant la TEM. Pour limiter ce risque, nous avons utilisé des rats jeunes (125 g, soit âgés d'environ 5 semaines) car nous avons constaté que le risque de contamination fibroblastique était plus élevé avec l'utilisation de rats plus âgés. De plus, de la *cis*-hydroxy-L-proline a été systématiquement ajoutée au milieu de culture pendant les 48 premières heures de culture. Cette molécule est un analogue de la proline, qui inhibe la synthèse de collagène par les fibroblastes et leur prolifération ([Kao 1977](#)). Ces différentes précautions ont permis de garantir une pureté cellulaire satisfaisante atteignant plus de 92% (testé par marquage des corps lamellaires par la phosphine 3R), les contaminants étant principalement des macrophages. Les marqueurs mésenchymateux tels que α -SMA ou vimentine n'ont été qu'exceptionnellement détectés par Western blot ou immunofluorescence à 4 ou 6 jours de culture (Figure 1A), et lorsque c'était le cas, les cultures ont été exclues de l'étude en raison d'une probable contamination fibroblastique lors de l'isolement.

Dans ce travail, nous avons étudié des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. La diminution ou disparition des premiers et l'apparition des seconds évoquent une TEM. Néanmoins, les propriétés myofibroblastiques n'ont pas été étudiées ici. En particulier, nous n'avons pas évalué l'impact de ces changements phénotypiques sur la motilité des cellules et leur production de collagène, données qui permettraient de « renforcer » la notion de TEM, au moins in vitro, comme cela a pu être rapporté dans de précédentes études ([Willis 2005](#), [Yang 2013](#)).

Enfin, nos expériences montrant l'effet bénéfique du KGF sur la prévention de la TEM dans les CEA induite en hypoxie, nous avons testé l'effet du milieu conditionné de CSM déplété en KGF. De manière intéressante, ce milieu n'était plus capable d'induire la diminution de la transcription de TWIST1 en hypoxie, mettant ainsi en avant son rôle essentiel dans la prévention de la TEM par les CSM. Il aurait cependant été préférable de garder le modèle de co-culture avec l'utilisation de CSM ne produisant plus de KGF. Cependant, la méthode de siRNA employée lors de plusieurs tentatives afin d'inhiber l'expression de KGF n'était pas optimale entre nos mains, la sécrétion de KGF déterminée en ELISA n'étant diminuée environ que de 50 à 60%.

6.4.2. Influence de l'Hx chronique sur le phénotype des CEA

La mesure des résistances trans-épithéliales (R_{TE}) permet d'évaluer le caractère plus ou moins serré des jonctions intercellulaires dans des monocouches de cellules cultivées sur filtre semi-perméable. En condition normoxique, les R_{TE} de CEA en monocouches atteignent un pic à J6 ($1635 \pm 395 \Omega.cm^2$), témoignant du caractère serré des jonctions, puis décroissent progressivement pour atteindre des valeurs voisines de $600 \Omega.cm^2$ à J13 de culture, ce qui reste acceptable. La caractérisation phénotypique des CEA primaires de rat en culture en condition normoxique a montré que ces cellules conservaient au cours du temps l'expression de marqueurs épithéliaux typiques des PII (expression des transcrits des protéines du surfactant SPA, SPB et SPC jusqu'à au moins J6, expression nucléaire de TTF-1 jusqu'à J13). Cependant, les cellules exprimaient également des marqueurs typiques de PI, tels que l'AQP5, détectable à partir de J3 après l'isolement. Ce phénomène, précédemment rapporté dans la littérature ([Borok 1997](#), [Willis 2005](#)), indique que les CEA primaires de rat adoptent progressivement en culture un phénotype intermédiaire avec des caractéristiques de PII et de PI, mais restent clairement des cellules épithéliales.

En hypoxie, les valeurs de R_{TE} chutent drastiquement après 6 jours, et plus encore après 12 jours. Cette diminution des R_{TE} en hypoxie s'accompagne de profondes modifications morphologiques, avec des cellules qui perdent progressivement leur aspect polygonal. L'expression des marqueurs épithéliaux est modulée de manière différentielle dans le temps. L'expression du facteur de transcription nucléaire TTF-1 et de l'AQP5 est rapidement diminuée (entre 4 et 6 jours), tandis qu'il faut attendre un temps plus long (12 jours) pour observer une franche diminution de l'E-cadhérine et la disparition de ZO-1. Les marqueurs mésenchymateux (vimentine, α -SMA), quant à eux, apparaissent après une hypoxie longue (12 jours), en même temps que l'extinction des marqueurs épithéliaux.

6.4.3. Mécanismes de la TEM en hypoxie

6.4.3.1. Rôle de l'hypoxie et implication de la voie HIF

Dans nos expériences, les facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF1- α et HIF2- α sont rapidement stabilisés en hypoxie. Dès les 2 ou 3 premières heures d'hypoxie, les 2 isoformes sont détectables en Western blot, bien que HIF1- α le soit plus rapidement. L'expression de HIF2- α est transitoire et disparaît lors d'une hypoxie prolongée de 48h, contrairement à HIF1- α qui reste stabilisé bien qu'à un niveau plus faible. Le rôle de l'hypoxie (et notamment de HIF) dans l'induction de la TEM a été montré dans un modèle de fibrogenèse rénale ([Higgins 2007](#)). Son rôle a été assez peu analysé dans des modèles d'agression pulmonaire mais cependant son influence a été mise en évidence dans des lignées de cellules épithéliales chez différentes espèces (A549 chez l'Homme, RLE-6TN chez le rat, MLE 12 chez la souris) ([Zhou 2009](#)). L'induction de la TEM par HIF a été montrée en hypoxie, mais aussi lors de l'administration de chlorure de cobalt ($CoCl_2$), un inhibiteur des PHD ([Zhang 2013](#)). Le rôle de HIF1- α dans l'induction la TEM a été montré au cours de la fibrose rénale expérimentale chez la souris et également dans des cellules tumorales, permettant ainsi la progression de la maladie ou la dissémination de tumeurs ([Zhang 2013](#), [Higgins 2007](#)). D'autre part, HIF2- α est impliqué dans la TEM, la croissance tumorale et participe ainsi à la progression tumorale au niveau du poumon ([Kim 2009b](#)).

Parmi les nombreux gènes comportant un domaine de réponse à l'hypoxie (domaine HRE), certains sont impliqués dans la TEM, et représentent donc des cibles potentielles de HIF. Le profil d'expression de HIF1- α est corrélé à l'expression de SNAIL, l'E-cadhérine, la N-cadhérine et la vimentine ([Luo 2011](#), [Zhang 2013](#)). TWIST1 est sous la dépendance de HIF1-

α mais aussi de HIF2- α ([Yang 2008a](#), [Liu 2014](#)). De plus, les médiateurs pro-fibrosants TGF- β 1 et CTGF peuvent être induits par HIF- α ([Norman 2000](#), [Hung 2012](#), [Higgins 2004](#), [Finger 2014](#), [Xiang 2015](#)).

6.4.3.2. Autres facteurs de transcription impliqués dans la TEM

Nous avons étudié les différents facteurs de transcription impliqués dans ce phénomène. Dès les premières heures d'hypoxie, on constate une augmentation de l'expression de SNAIL, sans modification de sa transcription. Lorsque l'hypoxie est prolongée cependant, son expression revient à un niveau basal. Le facteur de transcription SNAIL réprime l'E-cadhérine ([Cano 2000](#)). De façon intéressante, la surexpression de SNAIL (et de SLUG) est observée en ARN et en protéine dans les A549 traités au TGF- β , comme dans les CEA isolées de poumons de souris 7 jours après avoir été traitées à la bléomycine ([Jayachandran 2009](#)). L'utilisation de siRNA dirigés contre SNAIL et SLUG a mis en évidence le rôle pro-TEM de ces facteurs de transcription. En outre, chez les patients atteints de FPI, on note une surexpression de SNAIL, sans que sa transcription ne soit augmentée ([Jayachandran 2009](#)).

Dans nos expériences, ZEB1 et TWIST1 sont induits plus tardivement que SNAIL à 24h et 48h d'hypoxie, respectivement. TWIST1 n'est pas surexprimé dans les CEA issus de patients atteints de FPI, mais a été retrouvé dans les foci fibroblastiques ([Pozharskaya 2009](#), [Lomas 2012](#)). Il a par ailleurs été rapporté que l'expression de ZEB1 dans les CEA de patients atteints de FPI était corrélée au déclin de la fonction respiratoire ([Park 2014](#)).

L'étude de ces facteurs de transcription a été réalisée dans notre étude de manière globale, sans analyser l'impact de chacun de manière indépendante. L'activation de ces facteurs est complexe, avec de nombreuses voies d'activation et de régulation, ainsi qu'une coopération entre ces facteurs entraînant une boucle de régulation positive ([Lamouille 2014](#)). Néanmoins, nous retrouvons bien la cinétique précédemment rapportée dans la littérature, avec d'abord l'activation de SNAIL, puis celle de ZEB1 et enfin celle de TWIST1.

6.4.3.3. Les facteurs pro-fibrosants

Le TGF- β 1 et le CTGF sont des inducteurs des facteurs de transcription décrits ci-dessus (pour revue [Nieto 2002](#), [Dave 2011](#)). La transcription et sécrétion apicale du TGF- β 1 est augmentée dès les 24 premières heures d'hypoxie, tandis que cette augmentation est relevée

plus tard à 48h concernant le CTGF. Ce résultat est cohérent du fait que le CTGF soit une cible transcriptionnelle du TGF- β ([Grotendorst 1997](#), [Bonniaud 2005b](#)). Dans notre modèle, les concentrations de TGF- β 1 activé dans le milieu apical des CEA en hypoxie sont de l'ordre de 50 pg/ml. Ces concentrations sont 20 à 100 fois moins élevées que les concentrations de TGF- β 1 recombinant humain utilisées dans les modèles de TEM induite par le TGF- β 1 utilisant également des CEA de rats en culture primaire ([Willis 2005](#)). Néanmoins, elles sont comparables aux concentrations mesurées dans le milieu de culture de CEA de rat exposées 48h à l'hypoxie par Zhou et al ([Zhou 2009](#)). Dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur du TGF- β 1 (le SB431542) suffisait à réprimer la TEM en hypoxie ([Zhou 2009](#)), soulignant le rôle clé de la voie du TGF- β 1 dans la TEM induite par l'hypoxie. Dans des expériences complémentaires, nous avons montré que le traitement des CEA hypoxiques par le SB431542 inhibait la transcription de TWIST1 et de CTGF, et prévenait la perte du marqueur épithélial TTF1 observée à J6. La concentration observée de TGF- β 1 serait ainsi, tout du moins dans notre modèle en hypoxie, suffisante pour déclencher la TEM par un mécanisme autocrine.

6.4.4. Rôle paracrine des CSM

Cette étude met en avant des propriétés intéressantes des CSM. En effet, de par leurs capacités sécrétoires, les CSM permettent de préserver le phénotype épithélial des CEA. Cette inhibition de la TEM passe par la diminution de l'expression de TGF- β 1 et de CTGF, et des facteurs de transcription TWIST1 et ZEB1, alors que la stabilisation de HIF et la transcription de SNAIL ne sont pas modulées.

Les CSM sécrètent de très nombreux médiateurs. Nous nous sommes intéressés particulièrement au KGF, dont le rôle bénéfique pour les CEA a déjà été rapporté dans plusieurs études ([Lee 2009a](#), [Goolaerts 2014](#), [Zhu 2014](#), [Li 2015](#)). Dans notre modèle, la concentration de KGF dans le milieu conditionné des CSM s'élevait à des valeurs moyennes de 273 pg/ml. Les expériences réalisées avec du KGF recombinant humain à ces concentrations montrent que celles-ci sont suffisantes pour diminuer la sécrétion apicale de TGF- β 1 et prévenir la TEM (maintien des R_{TE} et de l'expression de TTF-1 et de ZO-1, inhibition de la transcription de TWIST1). A l'inverse, l'utilisation de milieu conditionné déplété en KGF ne parvient plus à réprimer la transcription de TWIST1. Le KGF semble donc être un facteur nécessaire pour inhiber la TEM induite par l'hypoxie. Cependant, d'autres médiateurs paracrines sont sans doute également impliqués. En effet, le KGF recombinant ne

supprime pas l'induction de ZEB1 en hypoxie alors que la co-culture avec les CSM le fait, suggérant la participation d'autres facteurs paracrines dans l'effet bénéfique des CSM.

Le rôle bénéfique du KGF est décrit dans de nombreux modèles d'agression alvéolaire in vivo et ex vivo (agression par l'hyperoxie, induction de SDRA ou de fibrose...) ([Panos 1995](#), [Yano 1996](#), [Guery 1997](#), [Lee 2009a](#), [Sakamoto 2011](#), [Lee 2013b](#), [Li 2015](#)). De manière intéressante, l'administration de KGF possède un effet bénéfique en prévention avant une agression, mais est également efficace lorsque l'administration est effectuée sur des poumons déjà lésés. Cet effet protecteur est également mis spécifiquement en évidence dans les CEA in vitro, en restaurant l'activité du transport transépithélial de sodium et en limitant leur apoptose ([Goolaerts 2014](#), [ci-dessous](#)).

Le KGF est connu comme inducteur de plusieurs voies de survie (AMPK, ERK1/2, JNK, p38) ([Qiao 2008](#)). La voie JNK (c-jun N-terminal kinase) est suggérée comme étant antagoniste de la voie du TGF- β 1 ([Wu 2009](#)). Il a également été rapporté que l'administration de KGF dans la peau inhibait la production de TGF- β 1 ([Pereira 2007](#)). Le mécanisme par lequel le KGF pourrait inhiber l'expression de TGF- β 1 dans les CEA n'est cependant pas clairement connu. Une hypothèse pourrait être l'implication des ROS dans ce phénomène. L'hypoxie en effet induit la production anormale de ROS par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, ROS qui peuvent s'accumuler dans le cytosol ([Chandel 1998](#), [Duranteau 1998](#), [Chandel 2000](#)). Ces espèces, toxiques pour la cellule, pourraient intervenir dans l'induction de la TEM ([Felton 2009](#)), et plus particulièrement dans la TEM induite par l'hypoxie ([Zhou 2009](#)). L'implication des ROS est confirmée par le fait que l'utilisation d'antioxydants (NAC, glutathion, Euk-134) inhibe la sécrétion de TGF β 1 par les CEA et la TEM, notamment au cours de l'hypoxie ([Felton 2009](#), [Borok 1991](#), [Zhou 2009](#)). Par ailleurs, les ROS peuvent activer le TGF- β latent dans le milieu extracellulaire, entraînant ainsi l'induction d'une TEM ([Jobling 2006](#)). De façon intéressante, dans plusieurs types cellulaires, le KGF présente une activité antioxydante. Le KGF permet en effet de réduire l'accumulation de ROS, en augmentant l'activité et/ou l'expression d'enzymes antioxydantes telles que la catalase, les SOD, la Gpx et la Peroxiredoxine ([Kovacs 2009](#), [Frank 1997](#), [Beer 2000](#), [Chowdhury 2014](#)). De plus, le KGF induit l'expression du facteur de transcription Nrf-2, connu pour stimuler l'expression d'enzymes impliquées dans la détoxification des ROS ([Braun 2002](#)). Ce facteur permet de réguler l'état redox de la cellule, et de prévenir la fibrose pulmonaire chez la souris ([Cho 2004](#), [Kikuchi 2010](#)). De manière intéressante, Nrf-2 pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la FPI ([Artaud-Macari 2013](#), [Walters 2008](#), [Hecker](#)

[2014](#)). De façon intéressante, nous avons constaté que le milieu conditionné des CSM diminuait l'accumulation des ROS en hypoxie dans les CEA primaires de rat en augmentant l'activité de certaines enzymes antioxydantes (ci-dessous). On peut donc émettre l'hypothèse que le KGF pourrait inhiber la sécrétion de TGF β 1 dans les CEA de rat hypoxiques via une stimulation des défenses antioxydantes et une réduction des ROS.

7.Effet des CSM sur l'apoptose des CEA induite par l'hypoxie

7.1. Hypothèse de travail et objectifs

L'apoptose accrue des CEA, notamment des CEA de type 2, est un phénomène pathologique observé aussi bien au cours du SDRA que de la FPI, bien que les voies apoptotiques impliquées soient en partie différentes dans ces deux pathologies (pour revue [Chambers 2015](#), pour revue [Matthay 2014](#)). L'hypoxie alvéolaire est susceptible de déclencher l'apoptose des CEA via deux voies de signalisations. D'une part, l'hypoxie entraîne la stabilisation du facteur de transcription HIF- α , induisant ainsi l'expression de nombreux gènes, dont certains codent des protéines pro-apoptotiques telles que Bnip3L ([Krick 2005](#)). D'autre part, l'hypoxie entraîne une production accrue d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) ([Chandel 1998](#)) dont l'accumulation est délétère pour les cellules (pour revue [Hamanaka 2009](#)). En effet, cette augmentation de ROS occasionne de nombreux dommages dans les cellules, et peut conduire à leur apoptose (pour revue [Kim 2015](#)). De manière intéressante, un déséquilibre de la balance entre facteurs oxydants et anti-oxydants est détectée dans le sang et les lavages broncho-alvéolaires (BAL) chez les patients atteints de FPI ou de SDRA ([Borok 1991](#), [Teramoto 1995](#), [Rahman 1999](#), [Lenz 1999](#), [Bowler 2003](#)).

Lors d'expériences préliminaires in vitro, nous avons constaté que l'hypoxie prolongée induisait une diminution progressive du nombre de CEA primaires de rat cultivées sur support semi-perméable, et que cette perte cellulaire était en partie prévenue par la co-culture avec des CSM humaines [Figure 34]. Ces données expérimentales suggèrent que la co-culture avec des CSM pourrait limiter la mort cellulaire des CEA au cours de l'hypoxie, en réduisant leur apoptose.

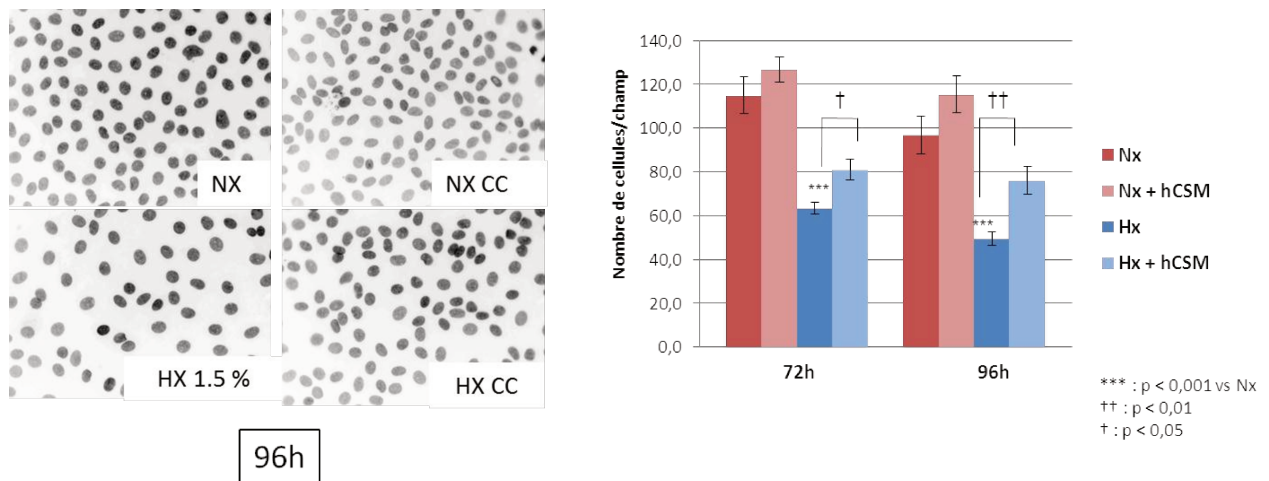


Fig 34. Evolution du nombre de CEA en fonction du temps, du taux d'oxygène en présence ou non de CSM. Nombre de noyaux (marqués au DAPI) par champ (x400) de CEA de rats cultivées seules sur support semi-perméables après une exposition de 72h ou 96h à la normoxie (Nx) ou à l'hypoxie (Hx, 1,5% O₂), ou co-cultivées dans les mêmes conditions avec des CSM humaines (Nx CC et Hx CC) (M2 Shalini Sivarajah).

Nous avons donc émis l'hypothèse que les CSM humaines pourraient exercer leur effet bénéfique en limitant de manière paracrine l'apoptose des CEA induite par l'hypoxie, favorisant ainsi la réparation alvéolaire après lésion.

Les objectifs de cette étude in vitro ont été :

- de mettre en évidence le rôle anti-apoptotique paracrine des CSM humaines sur les CEA de rats en hypoxie
- d'étudier les voies de signalisations apoptotiques déclenchées en hypoxie dans les CEA et l'impact du milieu conditionné des CSM humaines sur ces voies
- d'identifier des facteurs solubles sécrétés par les CSM susceptibles d'être impliqués dans leur effet cytoprotecteur

Ces travaux sont en cours de relecture par les auteurs avant soumission. J'ai pu exposer oralement les principaux résultats lors de différents congrès, notamment aux Journées de Recherche Respiratoire (J2R) en 2013 ou à l'European Respiratory Society international congress (ERS) 2015.

Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signalings

Olivier Bernard¹, Florence Jeny^{1,2}, Yurdagül Uzunhan^{1,2}, Elisabetta Dondi³, Rahma Terfous¹, Rabab Label¹, Angela Sutton⁴, Jérôme Larghero⁵, Valérie Vanneaux⁵, Christine Clérici^{6,7}, Hilario Nunes^{1,2}, Emilie Boncoeur¹, Carole Planès^{1,2} *, Nicolas Dard¹ *

* Carole Planès and Nicolas Dard equally contributed to this work

1: Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Hypoxie & Poumon (EA 2363), F-93017 Bobigny, France ;

2: AP-HP, Hôpital Avicenne, F-93009, Bobigny, France ;

3: INSERM, UMR 978, Bobigny, France.

4 : Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, 93000 Bobigny, France.

5: AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et CIC de Biothérapies, Paris, France ; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475 Paris, France ;

6: Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Inserm U1152, F-75018 Paris, France ;

7: AP-HP, Hôpital Bichat, F-75018, Paris, France.

Running head

Mesenchymal stem cells and alveolar apoptosis

Corresponding author

Dr Nicolas Dard

EA 2363, UFR SMBH

74 rue Marcel Cachin

F-93017 Bobigny, France

dard.nicolas@yahoo.fr

Abstract

Acute or chronic alveolar injuries provoke massive apoptosis of alveolar epithelial cells (AEC) that compromises an efficient repair of the alveolar epithelium and leads to lung diseases such as ARDS or IPF. These disorders are commonly associated with local alveolar hypoxia aggravating their progression through the stimulation of AEC apoptosis. Administration of allogenic mesenchymal stem cells (MSC) has been shown to limit lung inflammation and fibrosis in murine models of alveolar injury, through a still poorly understood paracrine mechanism. We studied whether MSC could protect AEC from hypoxia-induced apoptosis and the mechanisms involved. Rat primary AEC were exposed for 4-48 hrs to normoxia or hypoxia (1.5% O₂) in the presence or absence of human MSC conditioned medium (hMSC-CM). hMSC-CM significantly reduced hypoxia-induced apoptosis of AEC. Such an anti-apoptotic effect was also obtained with ROS scavenger N-acetylcystein or HIF-1 α inhibitor YC-1. hMSC-CM decreased the protein expression of HIF1 α and HIF2 α and their pro-apoptotic target Bnip3 in hypoxic AEC. hMSC-CM also reduced ROS accumulation and ROS-associated DNA damages in hypoxic AEC by enhancing the activity of antioxidant enzymes and prevented the induction of CHOP, a pro-apoptotic factor induced by ROS signaling. The paracrine effect of hMSC was partly dependent on KGF and HGF secretion. hMSC prevent via a paracrine effect hypoxia-induced apoptosis of AEC by modulating hypoxic and ROS signaling.

Key words

Mesenchymal stem cells, alveolar epithelial cells, apoptosis, hypoxia, Keratinocyte Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor

Introduction

Alveolar epithelium homeostasis is critical for pulmonary function and requires an efficient repair process in response to acute aggression or recurrent microinjuries. Alveolar epithelial cells (AEC) are often altered during lung injury, undergoing massive apoptosis. Their proliferation and differentiation play a key role in the repair process, but inefficient or aberrant repair can occur and lead to the development of pulmonary disorders such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) or acute respiratory distress syndrome (ARDS). IPF is characterized by the accumulation of fibroblasts and an excessive extracellular matrix deposition in alveolar septa, resulting in a re-arrangement of the pulmonary parenchyme architecture that may compromise a correct ventilation of alveoli (Chambers 2015). In ARDS, damages of endothelium and epithelium barriers result in increased permeability of the alveolo-capillary barrier leading to edema fluid accumulation that cannot be cleared efficiently (Matthay 2014). As a consequence, these lung diseases are commonly associated with local alveolar hypoxia events (Tzouveleakis 2007) that may aggravate their progression. Indeed, we and others have shown that hypoxia promotes AEC apoptosis (Krick 2005, Bouvry 2006) and AEC epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Zhou 2009), and therefore, hypoxia may participate to the physiopathology of lung fibrosis.

The main cellular responses to hypoxia are triggered by hypoxia-inducible factors (HIF). These heterodimer transcription factors consist of an O₂-regulated HIF- α subunit and an O₂-insensitive HIF-1 β subunit, whose activity relies on the stabilization of the α -subunit in response to low O₂ tension (Wang 1995, Ivan 2001). Overall, genes targeted by HIF help cells to adapt to hypoxic stress and to maintain homeostasis. However, HIF activation can also lead to initiation of pro-death pathways through the expression of Bcl-2 family members such as Bnip3 and Bnip3L (Guo 2001, Krick 2005). Another O₂-sensing mechanism resides in the electron transport chain of mitochondria and was shown to modulate signaling pathways through the generation of reactive oxygen species (ROS) (Chandel 2000,). Under normoxic condition, about 2% of O₂ consumed by mitochondria is incompletely reduced, leading to the generation of superoxide radicals. Cells possess a set of anti-oxidant enzymes acting in synergy to remove ROS and to

maintain the redox state stable (Nordberg 2001). During hypoxia, transfer of electrons to O₂ is impaired at the level of Complex III, resulting in a paradoxical increased production of ROS (Chandel 2000, Guzy 2005,) that is deleterious for the cells (Circu 2010).

There is currently no efficient treatment for ARDS or IPF. However, the use of mesenchymal stem cells (MSC) represents a very promising therapeutic approach. Indeed, the administration of allogeneic MSC has been shown to limit lung inflammation, fibrosis and mortality in various murine models of alveolar injury (Ortiz 2003, Gupta 2007). How MSC mediate their beneficial effects remains unclear but it is unlikely that it occurs through differentiation into AEC (Kotton 2005). There is increasing evidence indicating they promote lung repair through their ability to secrete a large variety of molecules such as immuno-modulating and anti-inflammatory cytokines (Nauta 2007, Ortiz 2007), or growth factors with anti-apoptotic (Ray 2003, She 2012, Fan 2000, Zhang 2008) or anti-oxidant properties (Valdès-Arzate 2009). However, little is known about the potential paracrine impact of exogenous MSC on AEC biology.

Here, we investigated *in vitro* whether human MSC could prevent apoptosis in primary AEC stressed by hypoxia, as well as the mechanism(s) involved. We show that human MSC conditioned medium (hMSC-CM) prevents rat AEC from hypoxia-induced apoptosis. Our data indicate that hMSC-CM protective effect relies on its capacity to modulate hypoxic signaling cascades in AEC by i) limiting HIF-1 α and HIF-2 α subunits accumulation, and ii) reverting ROS accumulation and redox imbalance. Consequently, expression of the pro-death proteins Bnip3 and CHOP is strongly down-regulated, while Bcl-2 expression is increased. Finally we show that this protective paracrine effect is partly dependent on keratinocyte and hepatocyte growth factors.

Materials and methods

Ethic Statement

All animals used in experiments reported in this publication were housed and handled by persons qualified by institutional committee according to University Paris 13 and the French Agriculture Department (agreement #B-93-008-01).

Isolation of AEC

Isolation of alveolar epithelial cells (AEC) was adapted from Planès et al. (Planès 2002). Briefly, lungs from pathogen-free male Sprague-Dawley rats (200-300 gr) were perfused and lavaged, then instilled with 8 ml of solution of elastase (4 U/ml; Worthington) for 15 min then instilled a second time with 7 ml elastase for 10 min. Lungs were minced in a solution containing 1 mg of DNase (Roche Diagnostics). After addition of fetal calf serum (FCS) (Sigma), free cells were separated from lung tissue by sequential filtration through sterile 100 μ m and 30 μ m nylon mesh. Cells were centrifuged 8 min at 115 g, resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco), and deposited on Petri-dishes plates. Non-adherent AEC were harvested one hour later and resuspended in DMEM. The percentage of alveolar type 2 cells as assessed by phosphine 3R staining of lamellar bodies was \geq 92% of freshly isolated cells, and cell viability was $>$ 95%. AEC were seeded at the bottom of plastic well plates (Corning), and grown in DMEM containing 25 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO₃, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10 μ g/ml gentamycin, and 10% FCS in a 5% CO₂ – 95% air atmosphere. The medium was changed 48h hours later and replaced with medium containing 5% FCS. Fifty separate AEC isolations and cultures were performed in this study, corresponding to 150 rats.

Isolation and culture of human mesenchymal stem cells

Human mesenchymal stem cells (hMSC) were isolated and purified from iliac crest bone marrow during bone marrow graft processing for allogeneic transplantation of consenting donors as described earlier (Arnulf 2007). hMCS were grown in minimum essential medium α (α -MEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml

penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 µg/ml gentamycin, 10% FCS and 1nM bFGF (Invitrogen). Human MSC used in this study were obtained from twelve healthy donors, and were used at passages 2 to 7.

hMSC conditioned medium preparation

In order to test the paracrine effect of hMSC on AEC death hMSC conditioned medium (hMSC-CM) was used. hMSC at 80% confluence were grown in DMEM containing 5% FCS for 24 hrs. Then, the supernatant was recovered, centrifuged at 15'000 g for 20 min, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Conditioned medium from normal human lung fibroblasts (NHLF; Lonza) was also prepared following the same protocol.

Recombinant growth factors and hMSC conditioned medium depletion

Recombinant human keratinocyte growth factor (rhKGF) (R&D systems) and hepatocyte growth factor (rhHGF) (R&D systems) were added to AEC culture medium according to the concentrations of KGF and HGF measured by ELISA (R&D systems) in hMSC conditioned medium.

Conversely, hMSC conditioned medium was depleted for KGF or HGF using proteinG/agarose beads (Sigma) coated with anti-KGF or anti-HGF monoclonal antibodies (R&D systems) or with anti-IgG antibodies (as a control). hMSC conditioned medium was incubated at 4°C overnight on wheel with antibodies-conjugated beads, then centrifuged to remove the beads. Depletion efficiency was assessed by ELISA.

Exposure to hypoxia

Culture of cells under hypoxic conditions was performed in a hermetic and humidified chamber (Saint Bernard Technologies, AYDAT) equilibrated with a gas mixture containing 1.5% O₂ - 5% CO₂ - 93.5 % N₂ (oxygen tension in culture media: 45 mmHg), and kept at 37°C for increasing periods of time (from 4 to 48 hours). Control normoxic cells were maintained in a 21% O₂ - 5% CO₂ - 74% N₂ humidified incubator for the same periods of time (oxygen tension in culture media: 140 mmHg).

Chemical treatments

In some experiments, cells were treated with 5 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC), (Sigma-Aldrich) to prevent the accumulation of radical oxygen species (ROS) and to investigate their possible involvement in the deleterious effects of hypoxia. In other experiments, cells were incubated with 10 μ M 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazole (YC-1) (Y102, Sigma-Aldrich), a compound that both decreases HIF1- α mRNA transcription and HIF1 transcriptional activity (Chun 2001, Kim 2006, Li 2008).

Flow-cytometry assessment of apoptosis

Cells were seeded in 12-well plates (Corning). Following experimental treatments, cells were washed twice with PBS. After rapid trypsinization, cells were incubated in DMEM with 10% FCS for 15 min to restore membrane integrity and then centrifuged for 3 min at 1300 rpm. Apoptotic cells were identified by detection of APC annexin-V binding (BD Pharmingen) on a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences). To exclude necrotic cells, cells were double-stained with 2 μ g/ml propidium iodide (Invitrogen).

Caspase 3/7 activity

AEC were scrapped in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 10% glycerol, 1 mM AEBSF, 5 mM EDTA, 10 μ M pepstatin, 0,8 μ M aprotinin). Cell lysates were sonicated, then centrifuged 30 min 4°C at 15'000 g, and protein content was determined using the Bradford method. Caspase activity was determined using 5 μ g extract and caspase glo 3/7 kit according to the manufacturer's instructions (Promega).

Antibodies

Rabbit anti-HIF1- α (NB100-479) and anti-HIF2- α (NB100-122) were purchased from Novus Biologicals) and used at 1:500 and 1:1000, respectively. Rabbit anti-catalase (#219010, Merck Millipore), anti-GPx1 (ab59546, Abcam), anti-SOD1 (Enzo life Sciences) and anti-SOD2 (Enzo life Sciences) were used at 1:1000, 1:10000, 1:5000, and 1:7500, respectively. Mouse anti- β -actin (SC47778) and anti-CHOP (SC-575) were purchased from Santa Cruz Biotechnology and used at 1:2000 and 1:500, respectively. Rabbit anti-Phospho-Histone H2AX (Ser139) (CS 2577, cell signaling) was used at 1:400.

Mouse anti-Bnip3 (B7931, Sigma-Aldrich) and rabbit anti- β -actin (A2103, Sigma-Aldrich) were used at 1:1000 and 1:10000, respectively. Secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-mouse antibodies (Jackson Laboratories) were used at 1:10000.

Immunoblotting analysis

Cells were grown in 6-well plates (Corning). Following appropriate treatments, cells were scraped on ice in phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation 5 min at 350 g at 4°C, the pellet was resuspended in lysis buffer (75 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1.2 mM NaVO₃, 1.2 mM PMSF, 1x protease inhibitors cocktail), and subjected to sonication. Cell lysates were cleared by centrifugation 30 min at 15'000 g at 4°C, and protein concentration was determined using Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). Typically, 30-100 μ g of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were blocked in TBS/Tween (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) dry milk powder and then incubated with primary antibodies (diluted in blocking solution) overnight at 4°C. Following washes with TBST, blots were incubated for 1 hr at room temperature with secondary antibodies. Immunoreactive bands were revealed with the ECL Luminata kit (Millipore) or West kit (Thermoscientific) visualised on an image capture system (Chemidoc MP, Biorad), and quantified with Image-lab software (Bio-rad). Levels of *protein* of interest were *normalized* to respective β -actin control.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNAs were extracted from AEC using the RNeasy mini kit (Qiagen). Reverse transcription was performed using a specific iScript cDNA synthesis kit (170-8890, Bio-rad), with the following procedure: 25°C 5 min, 42°C 30 min and 85°C 5 min in a thermal cycler (TC-512, Techne). Sequences of primers (Eurogentec) used for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were as follows: rat HIF-1 α , AGAGTCAAGCCCAGAGTCAC (forward) and TGGGACTGTTAGGCTCAGGT (reverse), rat HIF-2 α , AGCCCTACGGGGTTAAGGAA (forward) and CCGAGCTGCTCCTTTTCTTC (reverse), rat Bnip3, TCTCACTTAGTCGAGCCGC (forward) and GTGCAGACACCCAAGGATCA (reverse), rat Bnip3L, TCTCACTTAGTCGAGCCGC (forward) and TGGATGGAAGACGAGGAAGGA (reverse), rat β -actin

ACCGTGAAAAGATGACCCAGAT (forward) and CACAGCCTGGATGGCTACGT (reverse). qRT-PCR was performed using the following cycling parameters : activation 95°C for 15 min, denaturation 95°C for 15 sec, and annealing/extension 60°C for 1 min (40 cycles) on a RT-PCR system (StepOne Plus, Applied Biosystems). CT values were analyzed using the comparative CT (ddCT) method as described by the manufacturer (Applied Biosystems). The amount of target (2^{-ddCT}) was obtained by normalizing to endogenous reference gene (β -actin) sample.

Detection and quantification of reactive oxygen species

Cells were seeded on 96-wells plates. Before hypoxia treatment, cells were rinsed twice with PBS, then incubated with 10 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Molecular Probes) for 30 min at 37°C in dark. Cells were then washed, refed with medium and exposed to hypoxia for 24 hrs. Intracellular ROS oxidize the non-fluorescent H₂DCFDA, yielding a fluorescent product H₂DCF. The fluorescence of the probe was measured by a fluorimeter (Multiskan FC, thermo-scientific). Values were expressed as fold increase of fluorescence intensity (arbitrary units, a.u.) relative to values obtained at time 0 hr.

Antioxidant enzyme activities

AEC were scrapped in a lysis buffer (75 mM Tris pH 7.4, 1 mM PMSF, 1 mM DTPA, 1x protease inhibitor cocktail (Thermo scientific)). Cell lysates were sonicated, then centrifuged 10 min 4°C at 15'000 g, and protein content was determined using the Bradford method.

Catalase activity was measured as described previously by Beers and Sizer (Beers 1952). Cell lysates were diluted in a reaction buffer (20 mM KH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄), and a 30% H₂O₂ solution was added to the samples (0.15% v/v). Catalase activity was assessed with a spectrophotometer by recording the decay of H₂O₂ at 240 nm, and expressed in Ucat/mg.

GPx activity was determined using specific kit (Sigma-Aldrich), according to manufacturer's instructions. GPx activity was assessed with a spectrophotometer by recording the decay of NADPH absorbance at 340 nm, and expressed in UGPx/mg.

SOD activity was measured as described previously by Marklund (Marklund 1974). Briefly, cell lysates were diluted in a reaction buffer (50mM Tris, 1mM DTPA, buffered to pH 8.2 with 1.6M cacodylic acid), and a solution of 10mM pyrogallol was then added. The level of pyrogallol oxidation, which is inhibited by SOD, was measured by spectrophotometry at 410 nm. SOD activity was determined as the percentage of inhibition of pyrogallol oxidation, and expressed in USOD/mg.

Glutathione assay

AEC glutathione levels were determined using the GSH-Glo Glutathione Assay kit from Promega. The luminescence-based assay is based on the conversion of a luciferin derivative into luciferin in the presence of glutathione, catalyzed by glutathione S-transferase (GST). The signal generated in a coupled reaction with firefly luciferase is proportional to the amount of glutathione present in the sample. For AEC, 125'000 cells were plated per well in 96-well plates. The luminescence was measured by a luminometer (Bio-tek). The assay result is normalized using GSH standard solution provided with the kit. Values were expressed as the ratio of GSH to GSSG to illustrate the cellular redox balance.

Statistical Analysis

Each experiment was performed at least 3 times. Data are given as mean values +/- SEM. Statistical comparison between different treatments was performed using a paired t-test for comparisons between 2 groups, or when appropriate, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test with Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences with p value < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Human MSC conditioned medium protects alveolar epithelial cells from hypoxia-induced apoptosis

Exposure of primary rat AEC to severe hypoxia (1.5% O₂ for 24h to 48h) rapidly led to apoptosis. Indeed, analysis by flow cytometry of cells stained with annexin V and propidium iodide, indicated that hypoxia increased basal apoptosis of primary AEC from 6% to 11% and 14% after 24h and 48h exposure, respectively (Fig. 1A, $p < 0.001$). However, culture of AEC with hMSC conditioned medium (hMSC-CM) limited the deleterious effect of hypoxia (Fig. 1A), apoptosis of AEC being reduced to 8.2% and 12.2% after 24h and 48h exposure, respectively ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Similar results were observed when apoptosis was evaluated through the measurement of caspase 3/7 activity (Fig. 1B). Hypoxia induced a 3.5-fold increase in caspase 3/7 activity ($p < 0.001$), which was limited to a two-fold increase in the presence of hMSC-CM ($p < 0.01$). Interestingly, this protective effect was lost when hMSC-CM was heat-inactivated (Fig. 1C), suggesting it mainly depends on protein factors. In addition, culture of hMSC under normoxia or hypoxia did not impact the efficacy of conditioned medium (data not shown). By contrast, culture of AEC in the presence of conditioned medium prepared from normal human lung fibroblasts (NHLF-CM) had a more limited beneficial effect on hypoxic AEC (Fig. 1D). Taken together, these results show that hMSC partially prevent AEC from hypoxia-induced apoptosis through a paracrine mechanism.

Human MSC conditioned medium downregulates the HIF pathway and expression of the pro-apoptotic protein Bnip3

Next, we aimed at identifying the pathways involved in hypoxia-induced AEC apoptosis and in the hMSC-mediated cytoprotective effect. We first focused on the HIF pathway, which was previously shown to be pro-apoptotic (Krick 2005). HIF-1 α and HIF-2 α protein levels were significantly increased upon 4h exposure to hypoxia (Suppl. Fig. S1A and S1B) and a strong accumulation of both HIF-1 α and HIF-2 α proteins remained in primary AEC exposed to hypoxia for 24h ($p < 0.001$) (Fig. 2A and 2B). A decrease in HIF-1 α mRNA transcript levels after 24h of hypoxia was noticed, whereas levels of HIF-2 α transcripts remained unchanged (suppl. Fig. S1C, S1D), as previously described (Uchida 2004). Interestingly, treatment of AEC with YC-1, a compound which inhibits both HIF1- α mRNA transcription and HIF-1 α transcriptional activity (Chun

2001, Kim 2006, Li 2008), partly reduced HIF-1 α protein expression (Suppl Fig. S1E), and strongly reduced the apoptotic effect of hypoxia (Fig. 2C), supporting a role for the HIF pathway in this process.

We then analyzed the impact of hMSC-CM on HIF-1 α and HIF-2 α proteins levels. Incubation with hMSC-CM had no significant effect on HIF- α proteins upon short (4h) hypoxic exposure (Suppl. Fig. S1A and S1B). However, AEC exposed to hypoxia for 24h in the presence of hMSC-CM displayed a two-fold reduction in HIF-1 α (Fig. 2A) and HIF-2 α (Fig. 2B) protein levels as compared with hypoxic control ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively), with no change in HIF-1 α or HIF-2 α mRNA transcript levels (suppl. Fig. S1C-S1D). These data suggest that hMSC-CM may protect AEC from hypoxia-induced apoptosis through the modulation of HIF- α accumulation.

We next studied the expression of Bnip3, a target of HIF- α previously reported to induce apoptosis (Guo 2001). As shown in Fig. 2D, Bnip3 protein was hardly detectable in normoxic AEC, but was significantly increased after 24h of hypoxia. In contrast, incubation of hypoxic AEC with hMSC-CM strongly reduced Bnip3 expression (Fig. 2D). A similar result was observed when hypoxic AEC were treated with YC-1, an inhibitor of the HIF pathway (Fig. 2E).

Human MSC conditioned medium decreases hypoxia-induced ROS accumulation and inhibits the expression of the pro-apoptotic transcription factor CHOP

Production of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria during hypoxia represents another important hypoxic mechanism that may impact AEC function (Schumacker, 2011). In order to investigate whether AEC produced more ROS in response to hypoxia, cells were exposed to the H₂DCFDA probe which becomes fluorescent (H₂DCF) upon oxidation. After exposure to hypoxia for 24h, AEC displayed a higher level of fluorescence for H₂DCF, indicating an increase in ROS production (Fig. 3A, $p < 0.01$). Interestingly, the effect of hypoxia was reversed by hMSC-CM and by treatment of cells with N-acetyl-cysteine (NAC) anti-oxidant ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (Fig. 3A). Supporting this result, the ratio between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione was strongly shifted towards GSSG in hypoxic AEC (Fig. 3B), but this shift was attenuated when hypoxic cells were cultured in the presence of hMSC-CM (Fig. 3B). In addition, phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (noted γ H2AX), a well-known indicator of DNA damage, was significantly increased following

exposure to hypoxia (Fig. 3C). This increase was significantly blunted by incubation of hypoxic AEC with hMSC-CM (Fig. 3C).

We next tested the effect of the anti-oxidant NAC on hypoxia-induced apoptosis. As shown in Fig. 3D, treatment with NAC significantly limited apoptosis in hypoxic AEC. The accumulation of ROS has been shown to result in the generation of apoptotic signals through the induction of the transcription factor CHOP (Zinszner 1998). Therefore, we analyzed its expression by qRT-PCR and western blot. As shown on Fig. 4, CHOP expression was rapidly induced at the mRNA level and the protein level in AEC exposed to hypoxia for 4h, and this induction was totally suppressed when cells were treated with NAC (Fig. 4A and 4B). Also, incubation of AEC with hMSC-CM completely prevented the hypoxia-induced increase in CHOP protein expression (Fig. 4C). Interestingly, the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2, which is down-regulated by CHOP, was decreased under hypoxic condition but was completely restored by hMSC-CM treatment (Fig. 4D). Taken together, our results strongly suggest that hMSC may protect AEC from hypoxia-induced apoptosis through the modulation of the oxidant/anti-oxidant balance in AEC.

hMSC conditioned medium increases anti-oxidant enzyme activities in hypoxic AEC

We analyzed whether hMSC-CM modulates expression and activity of anti-oxidant enzymes in AEC exposed to hypoxia for 24h. As shown on Fig. 5A, superoxide dismutase (SOD) activity decreased under hypoxic conditions ($p < 0.05$), and culture of AEC with hMSC-CM prevented this decrease ($p < 0.05$). Glutathione peroxidase (GPx) activity remained unchanged upon hypoxia but was significantly increased by hMSC-CM ($p < 0.01$; Fig. 5B). Finally, Fig. 5C shows that catalase (CAT) activity did not change in hypoxic AEC but was markedly increased in the presence of hMSC-CM ($p < 0.01$). Except for SOD1 isoform, neither hypoxia nor hMSC-CM significantly impacted the protein levels of anti-oxidant enzymes (Suppl. Fig. S2A – S2D), indicating that hMSC-CM stimulates directly their activity without changing their expression levels.

KGF and HGF are involved in the protective effect of hMSC

Finally, we aimed at characterizing the molecular mechanisms involved in the beneficial effect of hMSC-CM. Since heat inactivation of hMSC-CM abolished its

protective properties (Fig. 1C), we focused on protein factors. Among the numerous proteins secreted by hMSC, keratinocyte growth factor (KGF) and hepatocyte growth factor (HGF) are known to display anti-apoptotic effects (She 2012, Zhang 2008) and to stimulate anti-oxidant enzymes (Valdès-Arzate 2009, Kovacs 2009). Therefore, AEC were treated with recombinant human KGF (rhKGF) or HGF (rhHGF) at concentrations similar to what was found in hMSC-CM. Mean concentrations of KGF and HGF in hMSC-CM as assessed by ELISA were: 202 +/- 45 pg/mL and 2315 +/- 889 pg/mL, respectively (n = 9). Interestingly, addition of rhHGF (2,5 ng/mL) or rhKGF (250 pg/mL) in cell medium significantly protected AEC from hypoxia-induced apoptosis, although this effect was partial ($p < 0.05$, Fig. 6A and 6B, respectively). Moreover, when both factors were combined, no cumulative effect could be observed (suppl. Fig. S3). These protective effects were lost when rhKGF and rhKGF were heat inactivated (Fig. 6A and 6B). Next, hMSC-CM was depleted in each of these factors using anti-HGF or anti-KGF antibodies coated columns and the efficiency of depletion was checked by ELISA. While depletion of KGF was complete, that for HGF was partial inasmuch as approximately 1/3 of the original rhHGF concentration (≈ 800 pg/mL) remained in the hMSC-CM after the procedure. Fig. 6C shows that depletion of KGF did not abolish the protective effect of hMSC-CM. Similar result was observed when hMSC-CM containing reduced levels of HGF was used (≈ 800 pg/ml) (data not shown). Finally, to investigate whether KGF and HGF have beneficial effects on redox balance, GSH/GSSG assays were performed in rhKGF and rhHGF-treated hypoxic AEC (Fig. 6D). GSH/GSSG ratio was significantly decreased in untreated AEC as compared with normoxic AEC, but not in AEC incubated with either rhKGF or rhHGF. Taken together, these results indicate that KGF and HGF (in combination with other factors) are involved in the beneficial effect of MSC and probably act through similar pathways modulating the cell redox balance.

Discussion

Lung fibrosis, because of distal lung remodeling, and ARDS, due to pulmonary edema, can lead to local alveolar hypoxia (Tzouveleakis 2007, Matthay 2014). The lack of oxygen may contribute to AEC apoptosis (Krick 2005, Bouvry 2006) and epithelial-mesenchymal transition (Uzunhan 2015) that can compromise an efficient alveolar repair. Administration of allogenic MSCs has been shown to produce beneficial effects *in vivo* in rodent models of pulmonary fibrosis and acute lung injury (Ortiz 2003, Gupta 2007) by paracrine mechanisms still not completely understood. In this *in vitro* study, we investigated whether hMSCs could exert an anti-apoptotic effect on primary AECs as well as the cellular mechanisms involved. The major findings of this study can be summarized as follows: 1) hMSCs partly prevent AECs from hypoxia-induced apoptosis, through paracrine mechanisms, involving epithelial growth factors such as KGF and HGF; 2) hMSC-CM reduces HIF-1 α and HIF-2 α protein accumulation occurring in hypoxic conditions, as well expression of Bnip3, a pro-apoptotic target of HIF-1 α ; 3) hMSC-CM prevents the accumulation of ROS and the alteration of cellular redox balance observed in hypoxic AEC through the stimulation of anti-oxidant SOD, CAT, and GPx enzyme activities; 4) hMSC-CM protects AECs from ROS-dependent DNA damages and from expression of the pro-apoptotic factor CHOP and enhances the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2.

Hypoxia-induced apoptosis has been addressed in AECs and other models, and a role for the HIF pathway has been evoked in several reports (Krick 2005, Althaus 2006, Wang 2012). In contrast to previous studies performed on A549 cell line, we found that HIF-1 α protein expression remained stable in primary AEC cultures exposed to 24 hours hypoxia (Uchida 2004). Here, treatment of hypoxic AECs with HIF-1 α inhibitor YC-1 partly reversed hypoxia-induced increase in HIF-1 α protein expression, and strongly reduced apoptosis of AECs. This strongly suggests the involvement of HIF1- α in AECs apoptosis, although we cannot completely rule out the role of HIF-2 α , as YC-1 might also affect HIF- α function through binding to its transactivation domain (Li 2008). HIF-1 α has been proposed to induce apoptosis through at least two mechanisms, namely, the stabilization of p53 tumor suppressor, and the modulation of pro-apoptotic Bcl-2 proteins. We did not observe any accumulation of p53 nor of its pro-apoptotic target Bnip3L, under hypoxic conditions (data not shown). Indeed, it seems that p53

stabilization rather requires conditions of severe hypoxia in combination with nutrient deprivation (Pan 2004). In contrast, the expression of Bnip3 protein was induced in hypoxic AECs, as previously observed in cardiomyocytes or in neurons (Wang 2012, Althaus 2006). Although closely related to Bnip3L, Bnip3 is not regulated by p53. Interestingly, YC-1 treatment reversed Bnip3 accumulation suggesting a role for HIF-1 α in Bnip3 expression as observed earlier (Althaus 2006), and supporting a predominant involvement of HIF-1 α in AEC apoptosis. However, HIF-2 α might also be involved in AEC apoptosis through induction of TRAIL and Caspase 7 (Turchi 2008).

Very elegant studies performed by the group of Schumacker revealed that hypoxia paradoxically results in the generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in mammalian cells (Chandel 1998, Guzy 2005). Here, we found that ROS accumulate in hypoxic primary AECs, resulting in redox imbalance and in DNA damages. Interestingly, treatment of AECs with anti-oxidant NAC reversed ROS accumulation and redox imbalance, and significantly reduced hypoxia-induced apoptosis, indicating a critical role of mitochondrial ROS in this process. ROS play a major role as mediators of apoptosis in the extrinsic and intrinsic pathways (Circu 2010). In the present study, we showed that hypoxia results in the induction of CHOP, a pro-apoptotic transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. Indeed, the expression of CHOP in hypoxic AECs was blunted by antioxidant treatment with NAC. CHOP was previously shown to induce Bax-dimerization and translocation from the cytosol to mitochondria, leading to cell apoptosis through the mitochondrial pathway (Gotoh 2004). Interestingly, our data show that CHOP up-regulation was associated with down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 protein (which prevents the translocation of Bax to the mitochondria), as observed earlier (McCullough 2001). ROS may also induce AEC apoptosis through other mechanisms. For instance, mitochondrial ROS were reported to activate apoptosis signaling SAPK/JNK in AEC (Soberanes 2009). Activation of SAPK/JNK promotes cytochrome c release (Kharbanda 2000), and mediates expression of pro-apoptotic TNF- α , FasL and Bak factors (Fan 2001). ROS may also promote apoptosis indirectly through activation of the HIF pathway. Indeed, ROS were shown to stabilize HIF- α subunit (Chandel 2000, Schroedl 2002). In line with this observation, our experiments revealed that incubation of AECs with NAC partly reduced hypoxia-induced accumulation of HIF-1 α but not that of HIF-2 α , (suppl Fig. S4).

In the present study, the protective effect of hMSC-CM was apparent on both branches of the hypoxia signaling response, preventing both HIF-1 α /HIF-2 α stabilization and ROS accumulation, and thereby blunting induction of their pro-apoptotic targets Bnip3 and CHOP. One should emphasize that this anti-apoptotic effect of MSCs on AECs was present despite the species difference between cells (human MSCs versus rat primary AECs). Rat primary AECs were used in this study as a surrogate of human AECs, which are very difficult to isolate. Unfortunately, human AEC cell lines such as A549 have a cancerous origin and display cancerous characteristics, which was not appropriate to study apoptosis in the context of acute lung injury or pulmonary fibrosis. Noteworthy, most factors secreted by MSCs show considerable homology across species and the beneficial paracrine effect hMSCs has been previously demonstrated *in vivo* in rodent models as well as *in vitro* on rodent cells (Islam 2012, Ortiz 2007, Goolaerts 2014, Uzunhan 2015). Although the species difference constitutes a limitation of our study, our model still represents a valuable tool for studying *in vitro* the crosstalk between AEC and MSCs.

How hMSC-CM affects HIF- α protein stability remains to be elucidated. The group of Semenza identified the receptor of activated protein kinase C (RACK1) as a HIF-1 α - interacting protein that promotes PHD/VHL-independent proteasomal degradation of HIF-1 α (Liu 2007). Similarly, the glycogen synthase kinase GSK3, or the forkhead transcription factor FOXO4, could down-regulate HIF- α by a pVHL-independent mechanism (Flügel 2007). Inhibition of diacylglycerol kinase abrogates HIF- α accumulation, via stimulation of PHD activity and HIF- α -pVHL interaction (Aragones 2001, Temes 2005). MSC could modulate HIF- α by promoting pVHL dependent and independent proteasomal degradation. In addition to modulating the HIF pathway, hMSC-CM did also reduce hypoxia-induced ROS accumulation in hypoxic AECs. Our data indicate that hMSCs acted through the stimulation of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) anti-oxidant enzymes activities. Because hMSC-CM had no impact on protein expression of these enzymes (suppl. Fig2), we speculate hMSC-CM directly regulates their activity, including delivery and accessibility of their cofactors. For instance, SOD activity depends on copper delivery, which is regulated by XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) and GSH (Brady 2010). This antioxidant effect of hMSCs on AECs is certainly an important finding, owing to the

deleterious role of oxidative stress in distal lung disease including ARDS and pulmonary fibrosis (Tasaka 2008).

Deciphering which factors secreted by hMSCs are able to mediate their cytoprotective effect represents a major challenge. Here, we found that KGF and HGF, two epithelial growth factors secreted by hMSCs, contribute to the anti-apoptotic effect of hMSC-CM inasmuch as recombinant hKGF or hHGF were able to reduce hypoxia-induced AEC apoptosis. Interestingly, conditioned medium prepared from normal human lung fibroblasts (NHLF) displayed lower levels of KGF and HGF and was less efficient in protecting AEC from hypoxia-induced apoptosis. Noteworthy, we have previously shown in hypoxic AECs that hMSC-mediated up-regulation of vectorial sodium transport and inhibition of epithelial-mesenchymal transition were partly related to the secretion of KGF by hMSCs (Goolaerts 2014, Uzunhan 2015). KGF and HGF are likely to mediate their anti-apoptotic effect through the same pathway, as they did not show synergic effect when added together in the culture medium (suppl. Fig3). HGF and KGF have been shown to protect cells from apoptosis through various mechanisms. One possible mechanism could be the induction of antioxidant pathways in hypoxic AECs. Indeed, HGF has been shown to stimulate glutathione reductase and to increase GSH/GSSG ratio through NF- κ B pathway (Valdés-Arzate 2009). Also, NF- κ B activation is associated with induction of XIAP (Stehlik 1998) and may therefore stimulate SOD activity in response to HGF. In several cell types, KGF reduces ROS accumulation, by promoting anti-oxidant activities, such as catalase and SOD (Kovacs 2009, Liu 2011). In epithelial cells, KGF stimulates p21-activated protein kinase 4 (PAK4) activity, which prevents oxidant-induced apoptosis (Lu 2003). Accordingly, we observed that incubation of hypoxic AECs with either KGF or HGF partially prevented the hypoxia-induced decrease in GSH/GSSG ratio. However, HGF and KGF could also protect cells from apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway (Fan 2000, Ray 2003) and expression of XIAP via Akt signaling (Takeuchi 2005).

Of note, hMSC-CM completely depleted in KGF (or partially depleted in HGF) still displayed an anti-apoptotic effect, suggesting that neither KGF nor HGF were necessary to prevent hypoxia-induced apoptosis. One can speculate that the absence of KGF in hMSC-CM could be compensated by the presence of HGF (and *vice versa*), on condition that the two growth factors share the same cellular pathways in AECs. This may also

suggest that either other factors secreted by hMSCs are involved and need to be identified. Moreover, hMSC-CM protective effect was partial as it did not reverse completely the percentage of apoptotic hypoxic AEC to the level of normoxic ones. We are currently investigating if hMSCs develop direct contacts with AECs via the formation of nanotubes or gap junction and transfer cytoplasmic material or mitochondria as observed in other models (Domhan 2011, Plotnikov 2010). Also, hMSCs have been shown to secrete microvesicles containing proteins, mRNA and miRNA (Bruno 2012). These MSCs-derived microvesicles are able to protect tubular cells from tubular injury-induced apoptosis (Bruno 2012). It was reported microvesicles exert anti-apoptotic and anti-oxidative effects after lung injury (Zhu 2014). Also, lymphocytes-derived microvesicles carry antioxidant enzymes, such as SOD isoforms and catalase, and are able to scavenge ROS directly (Soleti 2012).

In conclusion, this study provides evidence that hMSCs exert a cytoprotective anti-apoptotic effect towards AECs stressed by hypoxia by reducing HIF- α stabilization and ROS accumulation, partly related to the secretion of epithelial growth factors such as KGF and HGF. Alveolar hypoxia is frequently encountered in the course of distal diseases such as ARDS or acute exacerbation of IPF, and hypoxia-induced apoptosis of AECs most likely represents an important deleterious feature in the pathophysiology of these diseases. Therefore, the paracrine anti-apoptotic role of hMSCs most likely contributes to the beneficial effects of hMSCs administration observed in various *in vivo* models of lung injury associated with alveolar hypoxia.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms Patricia Quidu, Dominique Marchant, Ms Shalini Sivarajah and Dr Erwan Guyot for helpful technical assistance.

Grants

This work was supported by Legs Poix from Chancellerie des Universités de Paris, by University Paris 13, by the Idex Sorbonne Paris Cité (SPC), and by the Institut Fédératif de Recherche Biomédicale (IFRB).

Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

Althaus J, Bernaudin M, Petit E, Toutain J, Touzani O, Rami A. Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int.* 2006 Jun;48(8):687-95.

Aragonés J, Jones DR, Martin S, San Juan MA, Alfranca A, Vidal F, Vara A, Mérida I, Landázuri MO. Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):10548-55.

Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, Larghero J. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2007 Jan;21(1):158-63.

Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952 Mar;195(1):133-40.

Bouvry, D., Planès, C., Malbert-Colas, L., Escabasse, V. & Clerici, C. Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 519–527 (2006).

Brady GF, Galbán S, Liu X, Basrur V, Gitlin JD, Elenitoba-Johnson KS, Wilson TE, Duckett CS. Regulation of the copper chaperone CCS by XIAP-mediated ubiquitination. *Mol Cell Biol.* 2010 Apr;30(8):1923-36. doi: 10.1128/MCB.00900-09.

Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33115.

Chambers RC, Mercer PF. Mechanisms of alveolar epithelial injury, repair, and fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Mar;12 Suppl 1:S16-20.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29;95(20):11715-20.

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25130-8.

Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CM, Bae JM, Kim MS, Park JW. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem Pharmacol*. 2001 Apr 15;61(8):947-54.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010 Mar 15;48(6):749-62.

Domhan S, Ma L, Tai A, Anaya Z, Beheshti A, Zeier M, Hlatky L, Abdollahi A. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e21283.

Fan M, Goodwin ME, Birrer MJ, Chambers TC. The c-Jun NH(2)-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4450-8.

Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM. The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene*. 2000 Apr 27;19(18):2212-23.

Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007 May;27(9):3253-65.

Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jun 1;306(11):L975-85.

Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):390-402.

Guo K, Searfoss G, Krolkowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, Yu KT, Jaye M, Ivashchenko Y. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ.* 2001 Apr;8(4):367-76.

Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1855-63.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 2005 Jun;1(6):401-8.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):464-8.

Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):322-7.

Kim HL, Yeo EJ, Chun YS, Park JW. A domain responsible for HIF-1 α degradation by YC-1, a novel anticancer agent. *Int J Oncol.* 2006 Jul;29(1):255-60.

Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim DW. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):839-49.

Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Oct;33(4):328-34.

Kovacs D, Raffa S, Flori E, Aspite N, Briganti S, Cardinali G, Torrisi MR, Picardo M. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J Dermatol Sci.* 2009 May;54(2):106-13.

Krick S, Eul BG, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 May;32(5):395-403.

Li SH, Shin DH, Chun YS, Lee MK, Kim MS, Park JW. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}. *Mol Cancer Ther.* 2008 Dec;7(12):3729-38.

Liu CJ, Ha XQ, Jiang JJ, Lv TD, Wu C. Keratinocyte growth factor (KGF) gene therapy mediated by an attenuated form of *Salmonella typhimurium* ameliorates radiation induced pulmonary injury in rats. *J Radiat Res.* 2011;52(2):176-84.

Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell.* 2007 Jan 26;25(2):207-17.

Lu Y, Pan ZZ, Devaux Y, Ray P. p21-activated protein kinase 4 (PAK4) interacts with the keratinocyte growth factor receptor and participates in keratinocyte growth factor mediated inhibition of oxidant-induced cell death. *J Biol Chem.* 2003 Mar 21;278(12):10374-80.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep 16;47(3):469-74.

Matthay MA. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Jun 1;189(11):1301-8.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1249-59.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007 Nov 15;110(10):3499-506.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11):1287-312.

Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, and Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11002-11007, 2007.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8407-11

Pan Y, Oprysko PR, Asham AM, Koch CJ, Simon MC. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment. *Oncogene*. 2004 Jun 24;23(29):4975-83.

Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, Clerici C. Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47318-24.

Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Galkina SI, Sukhikh GT, Zorov DB. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp Cell Res*. 2010 Sep 10;316(15):2447-55.

Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, Chen L, Yang XF, Ray A. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6098-103.

Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov;283(5):L922-31.

Schumacker PT. Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Nov;8(6):477-84.

She J, Goolaerts A, Shen J, Bi J, Tong L, Gao L, Song Y, Bai C. KGF-2 targets alveolar epithelia and capillary endothelia to reduce high altitude pulmonary oedema in rats. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):3074-84.

Soberanes S, Urich D, Baker CM, Burgess Z, Chiarella SE, Bell EL, Ghio AJ, De Vizcaya-Ruiz A, Liu J, Ridge KM, Kamp DW, Chandel NS, Schumacker PT, Mutlu GM, Budinger GR. Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution. *J Biol Chem*. 2009 Jan 23;284(4):2176-86.

Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012 Dec 1;53(11):2159-70.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1998 Jul 6;188(1):211-6.

Takeuchi H, Kim J, Fujimoto A, Umetani N, Mori T, Bilchik A, Turner R, Tran A, Kuo C, Hoon DS. X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression level in colorectal cancer is regulated by hepatocyte growth factor/C-met pathway via Akt signaling. *Clin Cancer Res*. 2005 Nov 1;11(21):7621-8.

Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, Ishizaka A. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Apr;10(4):739-53.

Temes E1, Martín-Puig S, Acosta-Iborra B, Castellanos MC, Feijoo-Cuaresma M, Olmos G, Aragonés J, Landazuri MO. Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24238-44.

Turchi L, Aberdam E, Mazure N, Pouysségur J, Deckert M, Kitajima S, Aberdam D, Virolle T. Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell Death Differ*. 2008 Sep;15(9):1472-80.

Tzouveleakis A, Harokopos V, Paparountas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, Tsiambias E, Karameris A, Bouros D, Aidinis V. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1108-1119, 2007.

Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):14871-8.

Uzunhan Y, Bernard O, Marchant D, Dard N, Vanneaux V, Larghero J, Gille T, Clerici C, Valeyre D, Nunes H, Boncoeur E, Planès CI. Mesenchymal stem cells protect from

hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Dec 23;ajplung.00117.2015.

Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenobich D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):424-30.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.

Zhang J, Yang J, Liu Y. Role of Bcl-xL induction in HGF-mediated renal epithelial cell survival after oxidant stress. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan 1;1(3):242-53.

Zhou G1, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Dec;297(6):L1120-30.

Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, Qu JM, Matthay MA, Lee JW. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells*. 2014 Jan;32(1):116-25.

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998 Apr 1;12(7):982-95.

Figure legends

Fig. 1

Bernard et al. 2016

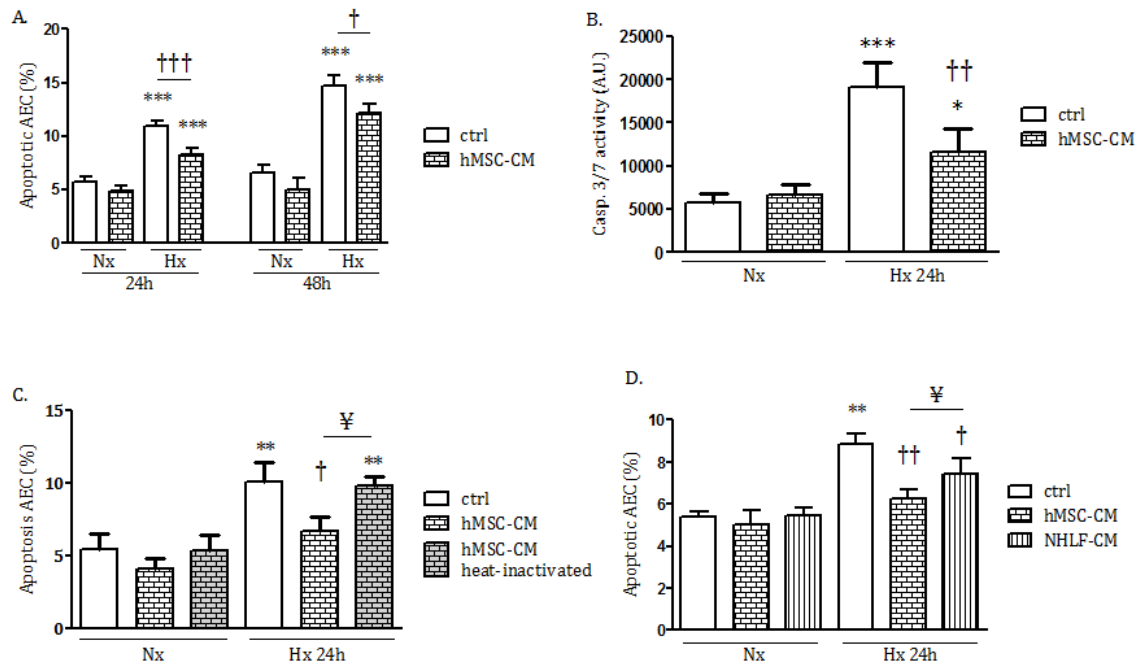


Fig. 1: hMSC conditioned medium (hMSC-CM) protects AEC from hypoxia-induced apoptosis.

(A, C, D) Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h to 48h in the presence or absence of native (A) or heat inactivated (C) hMSC-CM, or NHLF conditioned medium (cm-NHLF; D). After rapid trypsinization to detach cells from wells, apoptotic cells were quantified by flow cytometry for APC-conjugated annexin-V binding. To exclude necrotic cells, cells were double-stained with propidium iodide. (B) Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. AEC were scrapped in lysis buffer and apoptosis was followed by measurement of caspase activity using caspase glo™ 3/7 kit. The values are the means ± SEM of at least five independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05, †† P < 0.01 and ††† P < 0.001, significantly different from hypoxia control value. ¥ P < 0.05, significantly different between two conditions.

Fig. 2

Bernard et al. 2016

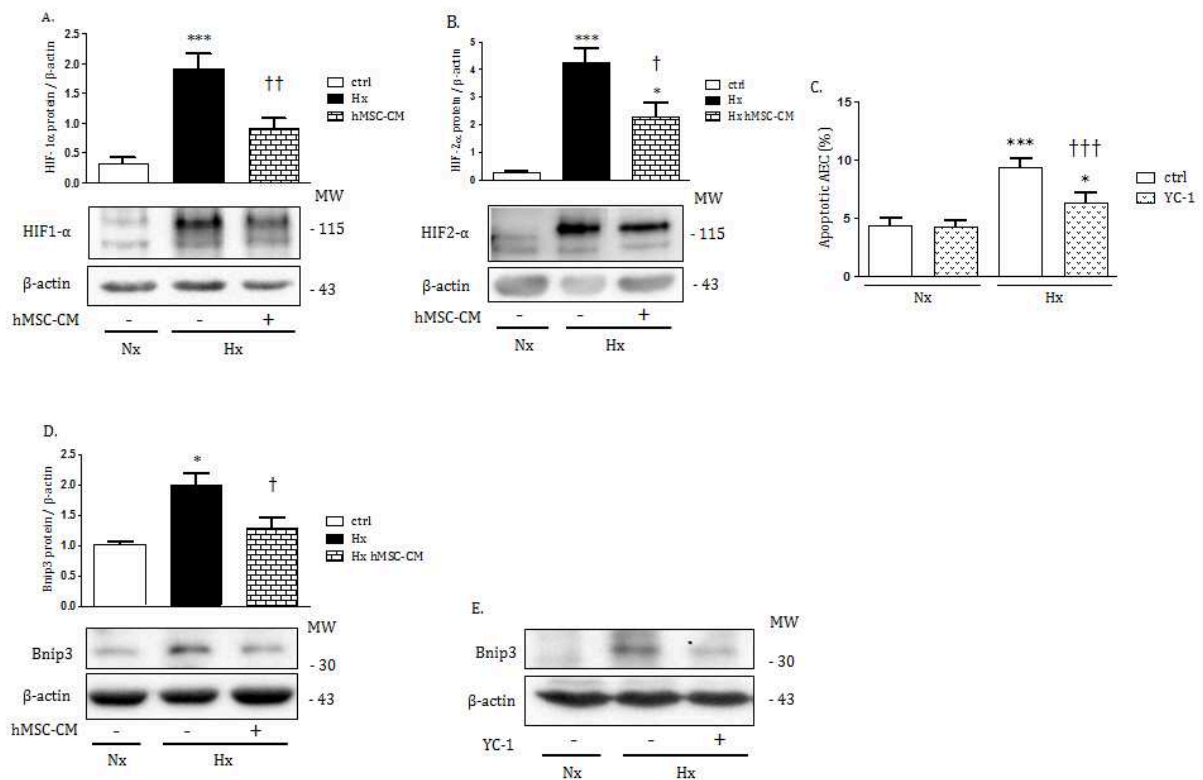


Fig. 2: Hypoxia-induced apoptosis of AEC involves the HIF pathway.

(A, B, D, E) Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM (A, B, D) or YC-1 (E). Protein extracts were prepared and western-blot performed to analyse HIF-1α (A), HIF-2α (B), and Bnip3 (D and E) protein expression. β-actin served as loading control. Densitometric analysis of HIF-1α, HIF-2α and Bnip3 bands was performed relative to β-actin bands. The values are the means ± SEM of at least four independent experiments (A to D). (E) One representative experiment of a total of two experiments is shown. (C) Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence (10μM) or absence of the hypoxia-inducible factor alpha inhibitor YC-1. After rapid trypsinization to detach cells from wells, apoptotic cells were quantified by flow cytometry using APC annexin-V binding. To exclude necrotic cells, cells were double-stained with propidium iodide. The values are the means ± SEM of six independent experiments. * P < 0.05 and *** P < 0.001, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05, †† P < 0.01 and ††† P < 0.001, significantly different from hypoxia control value.

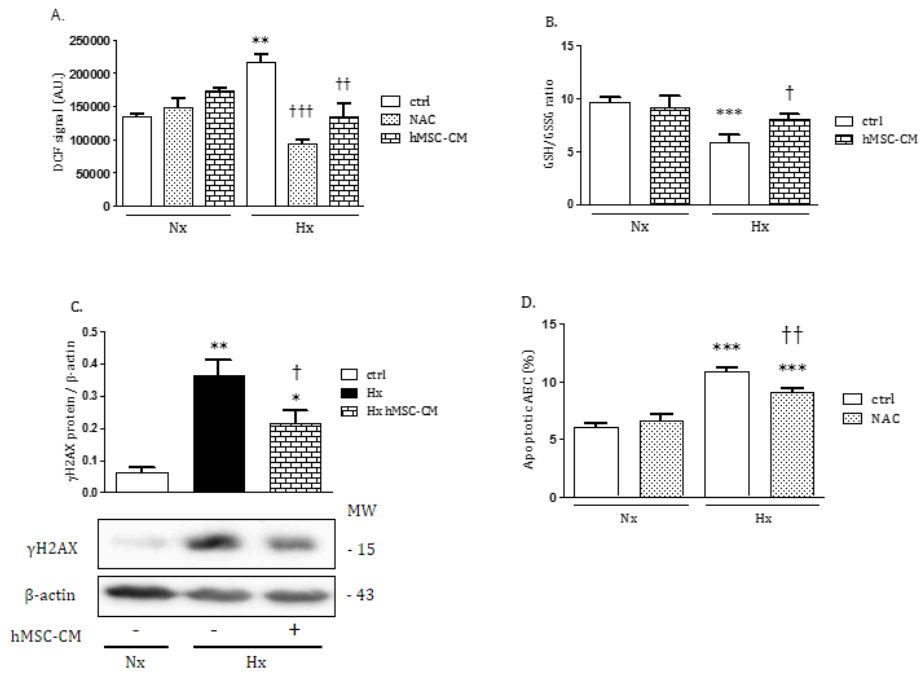


Fig. 3: hMSC-CM protects AEC from an increased deleterious ROS production induced by hypoxia.

(A) Cells were seeded in 96-well plates. After 2 days, cells were incubated with H2DCFDA for 30min, and then exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM or N-acetyl-cystein (NAC). The oxidized fluorescent H2DCF probe was measured by a plate reader. (B) Cells were seeded in 96-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia or hypoxia for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. The medium was then removed from wells, and 50µl of GSH-Glo™ Reagent was added. The GSH-Glo™ Assay reaction was stopped after 30 minutes by adding an equal volume of reconstituted Luciferin Detection Reagent, and after a 15-minute-incubation, luminescence was measured. (C) Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. Protein extracts were prepared and western-blot performed to analyse γH2AX. β-actin served as loading control. Densitometric analysis of γH2AX bands was performed relative to β-actin bands. (D) Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21%

O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of NAC. After rapid trypsinization to detach cells from wells, apoptotic cells were quantified by flow cytometry using APC annexin-V binding. To exclude necrotic cells, cells were double-stained with propidium iodide. The values are the means \pm SEM of 3 (A), 4 (C), 6 (B) or 7 (D) experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05, †† P < 0.01 and ††† P < 0.001, significantly different from hypoxia control value.

Fig. 4

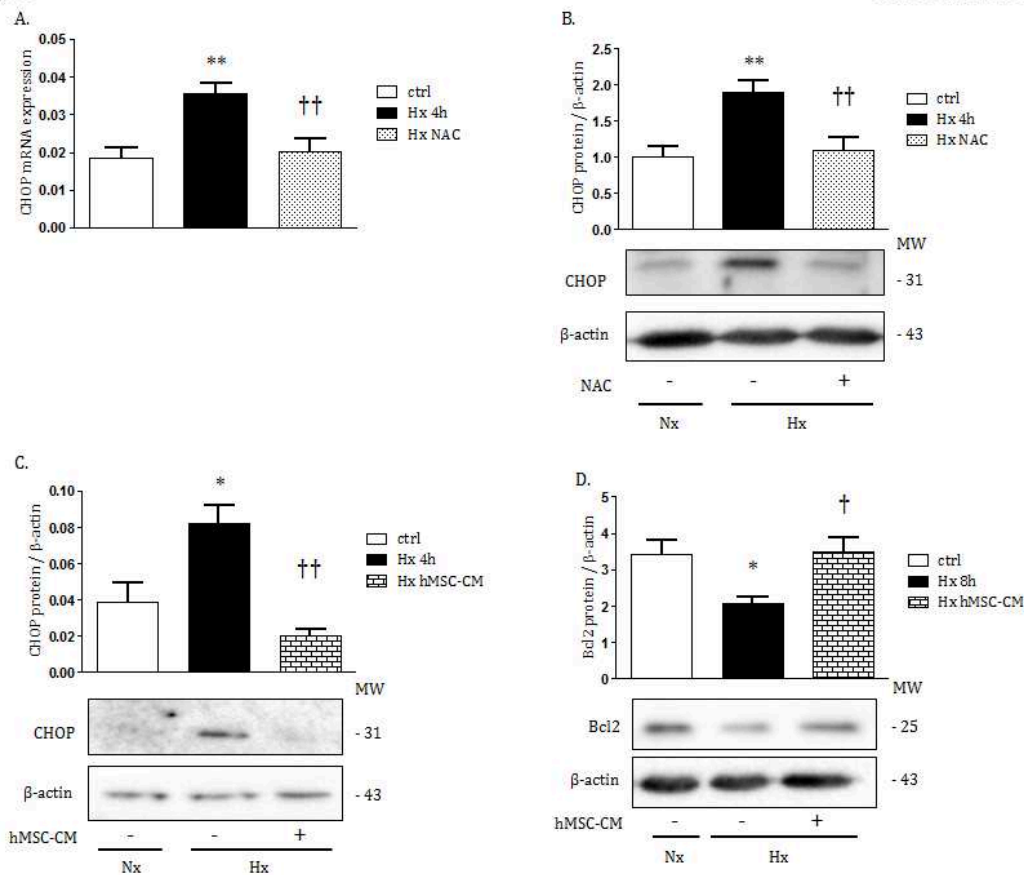


Fig. 4: Hypoxia-induced expression of the pro-apoptotic CHOP factor is abolished by hMSC-CM.

Cells were seeded in 12-well (A) or 6-well (B - D) plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 4h or 8h in the presence or absence of NAC or hMSC-CM. A) RNA extracts were prepared in order to follow CHOP mRNA levels by quantitative real-time PCR. (B - D) Protein extracts were prepared and western-blot performed to analyse CHOP and Bcl-2 protein expression. β -actin served as loading control. Densitometric analysis of CHOP and Bcl-2 bands was performed relative to β -actin bands. The values are the means \pm SEM of three (C) or four (A, B, D) independent experiments. *P < 0.05 and ** P < 0.01, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05 and †† P < 0.01, significantly different from hypoxia control value.

Fig. 5

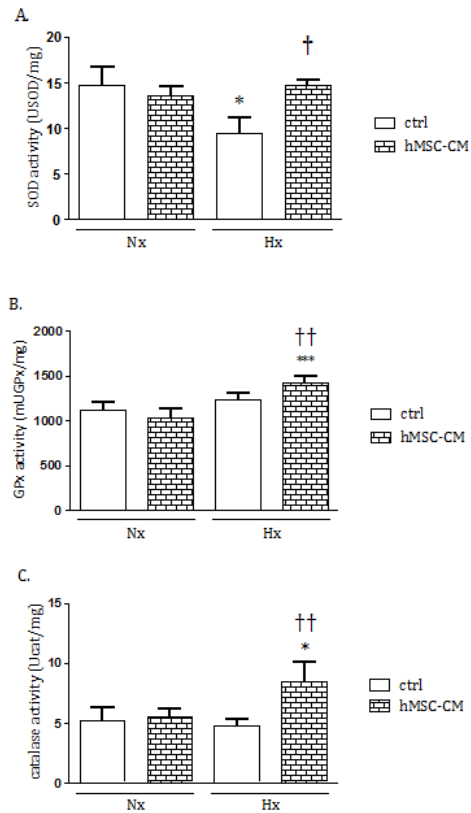


Fig. 5: hMSC-CM increases antioxidant enzymes activities in AEC.

Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. Protein extracts were prepared to measure total SOD activity (A), GPx activity (B), and catalase activity (C) by spectrophotometry. The values are the means \pm SEM of at least three independent experiments. *P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05 and †† P < 0.01, significantly different from hypoxia control value.

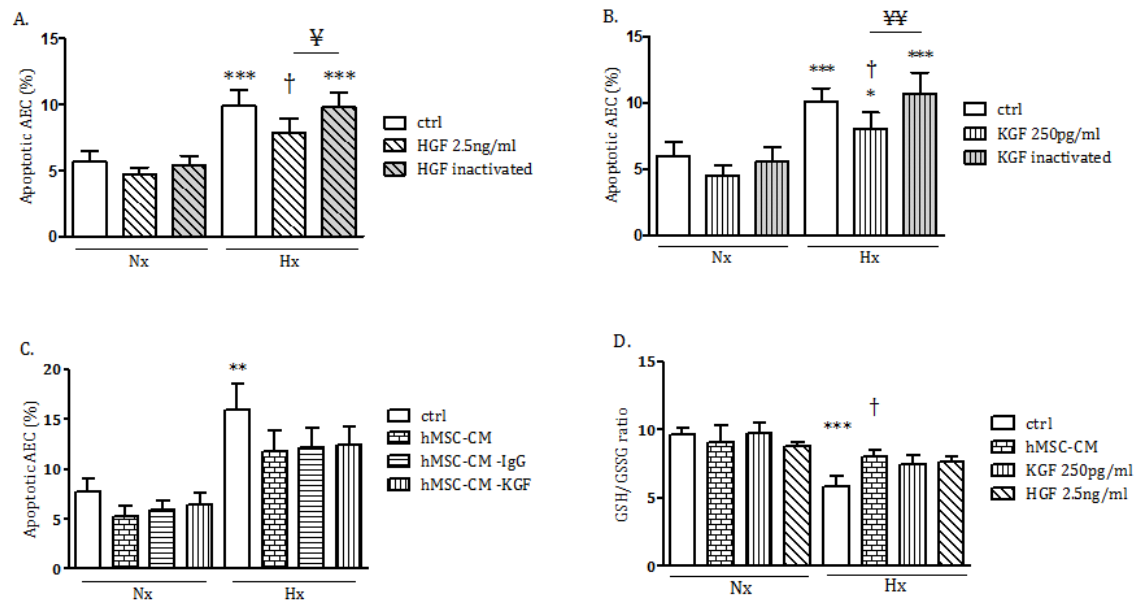


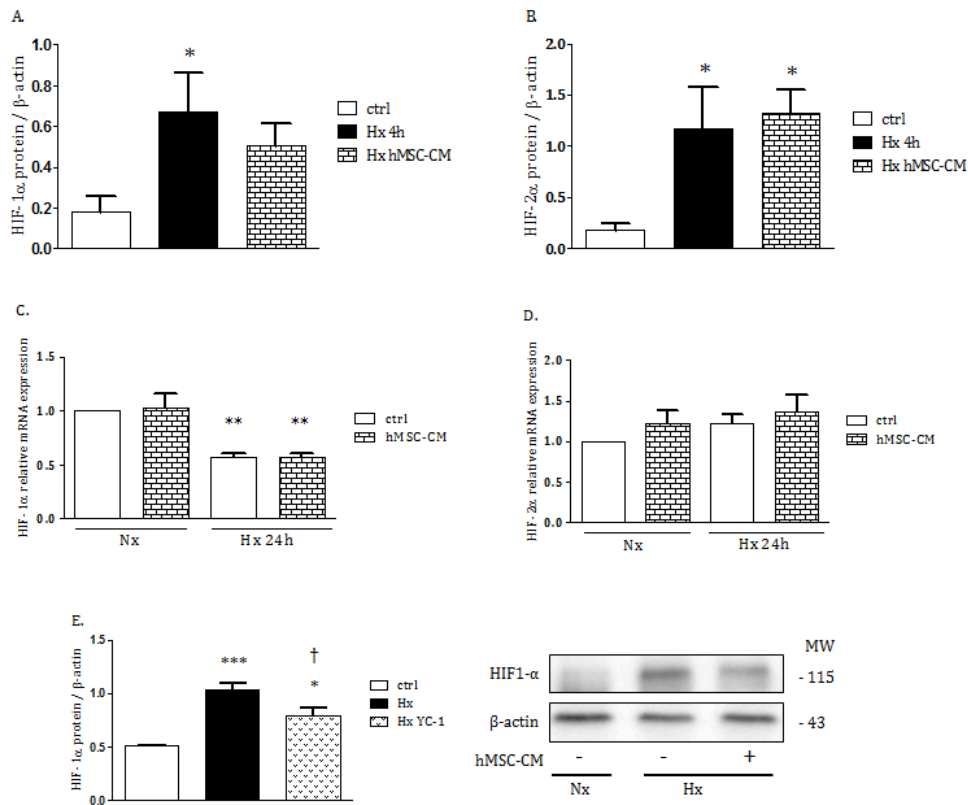
Fig. 6: Cytoprotective effect of hMSC involves paracrine factors, including KGF and HGF.

Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 24h in the presence or absence of recombinant human HGF (A), of recombinant human KGF (B), of hMSC-CM depleted or not for KGF (C). After rapid trypsinization to detach cells from wells, apoptotic cells were quantified by flow cytometry using APC annexin-V binding. To exclude necrotic cells, cells were double-stained with propidium iodide. (D) Cells were seeded in 96-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia or hypoxia for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. The medium was then removed from wells, and 50µl of GSH-Glo™ Reagent was added. The GSH-Glo™ Assay reaction was stopped after 30 minutes by adding an equal volume of reconstituted Luciferin Detection Reagent, and after a 15-minute-incubation, luminescence was measured. The values are the means ± SEM of at least four independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, significantly different from normoxia control value. † P < 0.05 and †† P < 0.01, significantly different from hypoxia control value. ¥ P < 0.05 and ¥¥ P < 0.01.

Supplemental figures

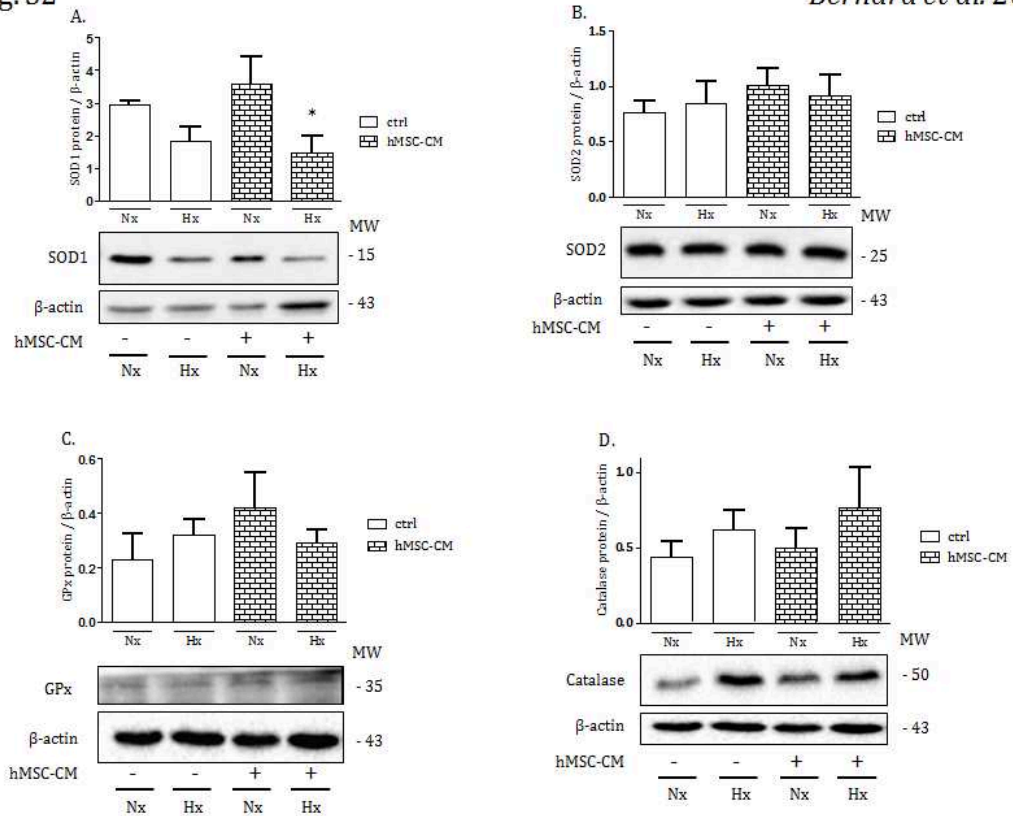
Suppl Fig. S1

Bernard et al. 2016



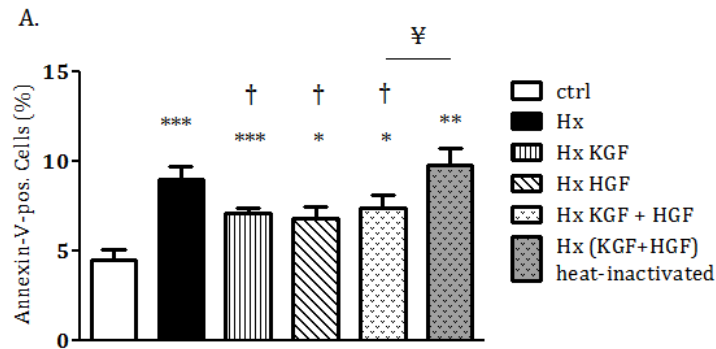
Suppl Fig. S1: Expression of HIF-1α and HIF-2α in hypoxic AEC.

(A, B, E) Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 4h (A, B) or 24h (E) in the presence or absence of hMSC-CM (A, B) or YC-1 (E). Protein extracts were prepared and analysed for HIF-1α (A, E) or HIF-2α (B) protein expression. β-actin served as loading control. Densitometric analysis of HIF-1α and HIF-2α bands was performed relative to β-actin bands. The values are the means ± SEM of at least four independent experiments. (C – D) Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. RNA extracts were prepared in order to follow HIF-1α (C) and HIF-2α (D) mRNA levels by quantitative real-time PCR. The values are the means ± SEM of five independent experiments. * P < 0.05 and ** P < 0.01, significantly different from normoxia control value. . † P < 0.05, significantly different from hypoxia control value.



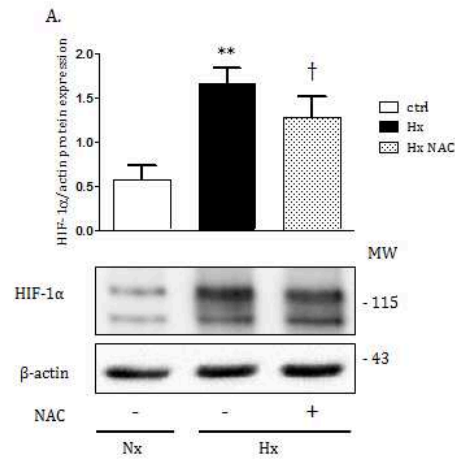
Suppl Fig. S2: Effect of hMSC-cm on SOD, GPx, and catalase expression in AEC.

Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 24h in the presence or absence of hMSC-CM. Protein extracts were prepared to analyze SOD1 (A), SOD2 (B), GPx (C), and catalase (D) proteins expression by western blot. β -actin served as loading control. Densitometric analysis of SOD1, SOD2, GPx, and catalase bands was performed relative to β -actin bands. The values are the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, significantly different from normoxia control value.



Suppl Fig. S3: Involvement of HGF and KGF in the protective effect of hMSC.

Cells were seeded in 12-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1.5% O₂) for 24h in the presence or absence of a combination of rhHGF (2.5ng/ml) and rhKGF (250pg/ml). After rapid trypsinization to detach cells from wells, apoptotic cells were quantified by flow cytometry using APC annexin-V binding. To exclude necrotic cells, cells were double-stained with propidium iodide. The values are the means \pm SEM of four independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significantly different from normoxia control value. † $P < 0.05$, significantly different from hypoxia control value. ¥ $P < 0.05$.



Suppl Fig. S4: NAC partly reduced hypoxia-induced accumulation of HIF-1 α .

(A) Cells were seeded in 6-well plates. After 2 days, cells were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1,5% O₂) for 24h in the presence or absence of NAC. Protein extracts were prepared and western-blot performed to analyse HIF-1 α protein expression. β -actin served as loading control. Densitometric analysis of HIF-1 α bands was performed relative to β -actin bands. ** $P < 0.01$, † $P < 0.05$.

7.2. Schéma de l'étude

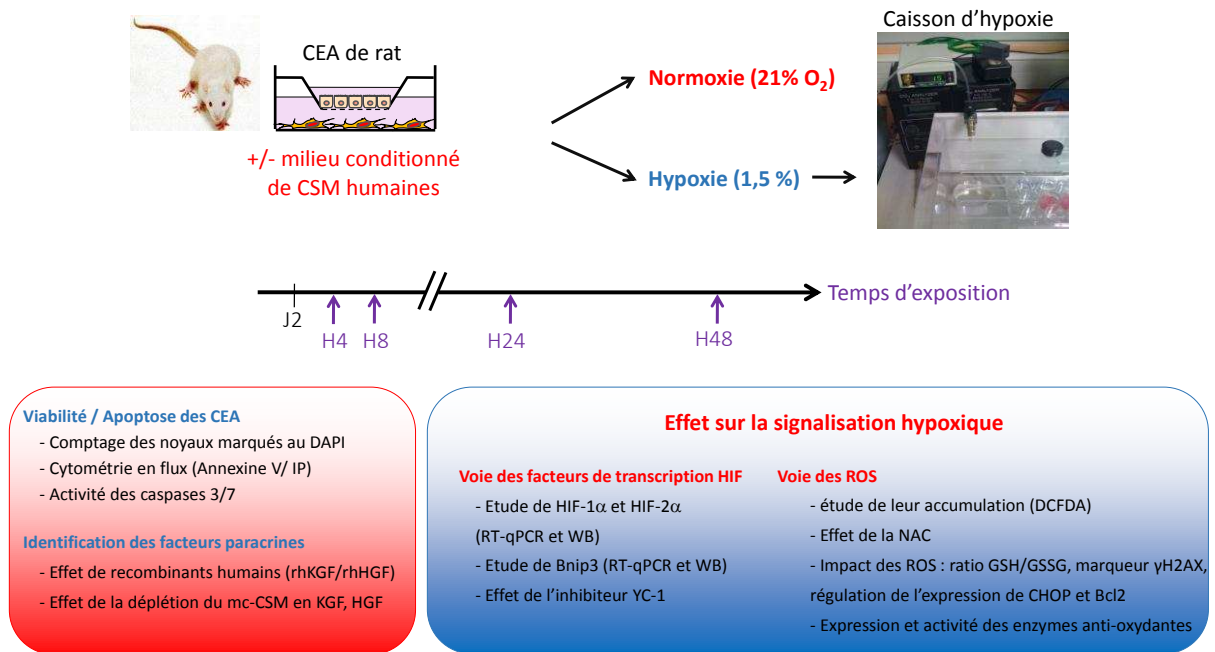


Fig 35. Schéma du protocole de l'étude 2.

7.3. Résumé des résultats

Ce travail a consisté en la caractérisation de l'effet protecteur des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) soumises à des conditions d'hypoxie. Plus particulièrement, le rôle paracrine des CSM a été étudié. Pour cela, seul le milieu conditionné réalisé à partir de CSM humaines (mc-CSMh) a été utilisé comme milieu de culture des CEA.

L'hypoxie sévère entraîne une diminution du nombre de CEA en culture au cours du temps, avec une perte cellulaire en hypoxie plus importante de 50% environ après 4 jours de culture, comparée à la culture en condition de normoxie. L'apoptose est un phénomène intervenant dans la mort cellulaire, qui est significativement augmentée après 24h d'hypoxie, et qui continue après 48h d'hypoxie. L'hypoxie entraîne une stabilisation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α , une augmentation de la transcription et de l'expression de Bnip3, une cible pro-apoptotique de HIF-1 α . D'autre part, l'hypoxie entraîne une accumulation de ROS, associée à une diminution du ratio GSH/GSSG, témoin de l'état d'oxydation cellulaire, et à une augmentation du γ H2AX, marqueur de réparation de l'ADN en réponse à des cassures doubles brin. L'expression des enzymes antioxydantes n'est pas modulée par l'hypoxie, bien qu'une tendance à la diminution de l'expression de SOD1 soit observée. L'activité enzymatique des SOD est diminuée en hypoxie, lorsque celles des GPx et de la catalase sont augmentées. La transcription et l'expression de CHOP sont induites de manière précoce et transitoire en hypoxie, quand Bcl-2, une de ces cibles anti-apoptotique, voit son induction diminuer après 24h d'hypoxie.

La culture des CEA en présence de l'inhibiteur de HIF, YC-1, ou en présence de la NAC, puissant antioxydant, limite l'apoptose des CEA en hypoxie, indiquant que ces deux voies hypoxiques sont impliquées.

Le mc-CSMh permet de prévenir la mort des CEA par apoptose, jusqu'au 4^{ème} jour de culture en hypoxie. La stabilisation de HIF-1 α et HIF-2 α dans les CEA est diminuée par le mc-CSMh, comme l'expression de Bnip3. Par ailleurs, le mc-CSMh limite l'accumulation des ROS en hypoxie, en augmentant notamment l'activité totale des SOD, de la catalase et des GPx sans pour autant moduler l'expression de ces enzymes.

L'ajout de rhKGF ou de rhHGF dans le milieu de culture suffit à diminuer l'apoptose des CEA en hypoxie. De manière intéressante, l'utilisation de mc-CSMh déplété en KGF garde

son effet anti-apoptotique. La déplétion en HGF n'étant efficace qu'à ~60%, il est plus difficile de tirer une conclusion. Par ailleurs, ces facteurs de croissance semblent prévenir la diminution du ratio GSH/GSSG observée en hypoxie.

Ces différents résultats montrent que les CSMh sont capables de prévenir l'apoptose des CEA en hypoxie, par des mécanismes paracrines impliquant les facteurs KGF et HGF et modulant les signalisations hypoxiques.

7.4. Discussion

7.4.1. Choix du support de culture

Dans cette étude, nous avons dans un premier temps réalisé nos cultures de CEA sur filtres Transwell® afin d'évaluer la perte cellulaire par comptage cellulaire. Par la suite, pour étudier l'apoptose, nous avons décidé de réaliser les cultures sur fond de plastique pour des raisons techniques. La culture des pneumocytes sur filtres semi-perméables est plus adaptée, dans le sens où ce mode de culture permet la mise en place de transports ioniques transépithéliaux efficaces. Cependant, dans les cultures de CEA en fonds de puits, on observe, après quelques jours de culture, la formation de cystes, dômes hémisphériques emplis de liquide. Ces structures apparaissent lorsque la pression exercée par le fluide accumulé au niveau basal devient supérieure à la force d'adhérence entre la cellule et le plastique, et traduit de ce fait l'établissement de jonctions serrées entre les CEA, et la formation in vitro d'un épithélium fonctionnel ([Mason 1982](#)).

Par la suite, afin d'étudier les voies de signalisations apoptotiques mises en jeu, nous avons, par soucis de cohérence, gardé ce modèle de culture en fond de plastique.

7.4.2. Choix de la durée d'exposition à l'hypoxie

L'impact de l'hypoxie sur la mort cellulaire a été étudié dans un premier temps en réponse à des durées d'exposition allant de 24h à 96h. Nous avons commencé par observer un effet protecteur du milieu conditionné de CSM dès 24h d'exposition, mais également à 48h et à 96h [Figure 36].

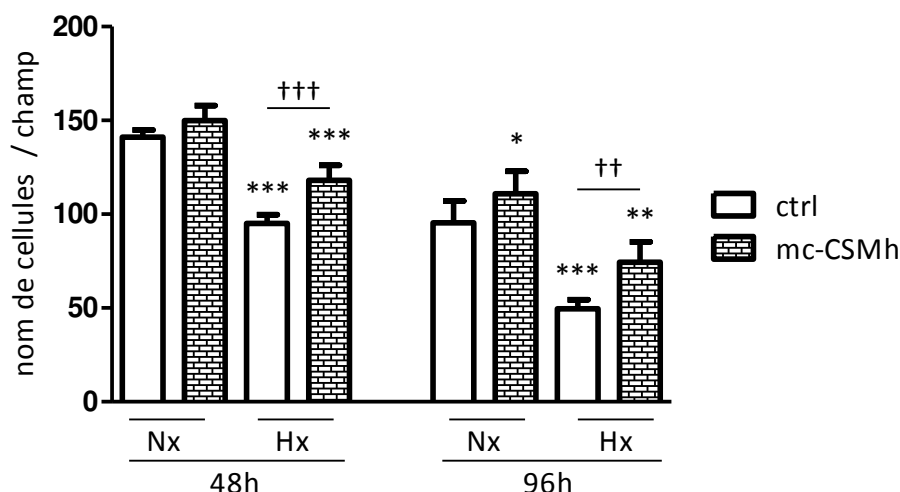


Fig 36. Effet du milieu conditionné de CSM sur la viabilité des CEA en culture.

* : significativement différent de la condition normoxie pour le temps donné

† : significativement différent de la condition hypoxie

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

† : $p < 0.05$, †† : $p < 0.01$, ††† : $p < 0.001$

Une des limites au fait d'effectuer des hypoxies longues de 96h est que nous devons changer le milieu de culture au bout de 48h. Ceci implique également de rompre l'hypoxie, conduisant à des événements d'hypoxie/ré-oxygénation susceptibles d'influencer le cours de nos expériences. Ainsi, par la suite, l'effet protecteur du milieu conditionné de CSM sur l'apoptose précoce des CEA a été analysé en réponse à une exposition de 24h et 48h d'hypoxie. Cependant, nous avons également souhaité étudier l'effet de la NAC, un agent antioxydant et le comparer à celui des CSM. Or, l'efficacité de la NAC étant de 24h, le milieu de culture doit être changé toutes les 24h. Ainsi, pour les expériences qui ont suivi, nous sommes restreints à une durée d'hypoxie maximale de 24h.

7.4.3. Préparation du milieu conditionné de CSM

Afin d'étudier l'effet paracrine des CSM, nous avons utilisé du milieu conditionné (mc-CSM) préparé uniquement avec des CSM cultivées en condition normoxique. En effet, du milieu conditionné réalisé en condition hypoxique exerce un effet anti-apoptotique identique

[Figure 37]. Cependant, il est intéressant de noter que les concentrations de HGF et KGF retrouvées dans les milieux conditionnés réalisés en condition normoxique et hypoxique sont similaires. Pour des raisons pratiques, le choix a ainsi été fait de n'utiliser que du mc-CSMh réalisé en condition normoxique.

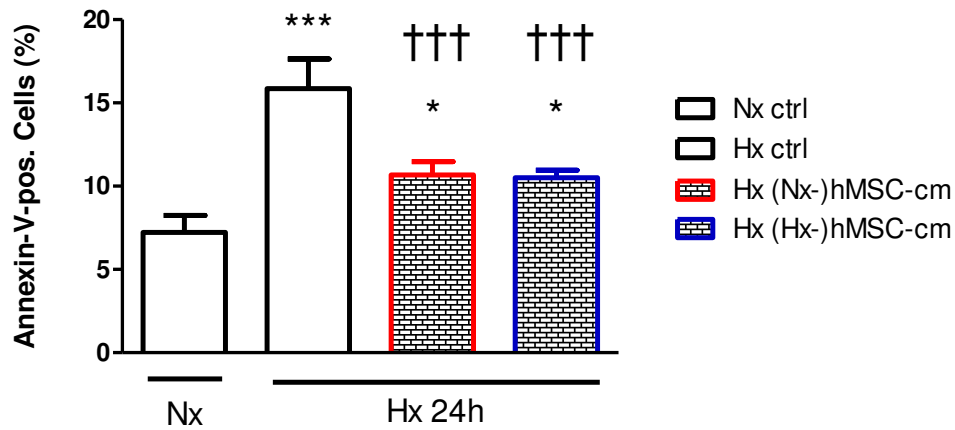


Fig 37. Effet du milieu conditionné réalisé en condition normoxique ou hypoxique sur l'apoptose des CEA en hypoxie.

* : significativement différent de la condition normoxie pour le temps donné

† : significativement différent de la condition hypoxie

* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$, ††† : $p < 0.001$

Bien que le milieu conditionné préparé en condition normoxique ou hypoxique ait le même effet protecteur in vitro, il semblerait que des différences puissent apparaître in vivo. En effet, dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine, Lan et son équipe se sont aperçus que le milieu conditionné avait un meilleur effet protecteur, lorsque ce dernier était préparé en condition hypoxique (Lan 2015). De manière intéressante, des CSM hypoxiques sont retrouvées, résidantes dans le poumon 21 jours après instillation intratrachéale (Lan 2015). Au niveau du sécrétome des CSM murines utilisées, l'expression de HGF, des enzymes anti-oxydantes HO-1 et catalase est augmentée lorsque la culture est effectuée en condition hypoxique.

Par ailleurs, le mc-CSMh peut présenter une efficacité variable tant sur l'apoptose que sur les autres paramètres cellulaires étudiés. Différents éléments peuvent expliquer cette variabilité :

- Le nombre de CSM comptées au laboratoire après recueil du milieu conditionné peut varier jusqu'à ~30%, malgré le fait d'attendre, visuellement, d'avoir une confluence estimée à 80% avant la mise en condition. Cette différence peut entraîner une variabilité de concentration des facteurs retrouvés dans le mc-CSMh. Ainsi, la concentration de HGF notamment varie sensiblement selon les cultures (2315 +/- 889 pg/ml).
- Le passage des CSM pourrait être un facteur limitant l'effet protecteur en hypoxie. Bien que les dosages de facteurs de croissance ne soient pas différents selon le nombre de passage des CSM, nous avons eu tendance à constater un effet moins net avec le temps.
- Certains lots de CSM étaient peu efficaces dans nos expériences, quel que soit le passage utilisé.

7.4.4. Implication et modulation de la voie HIF

De manière surprenante, lors de la première étude, nous avons constaté que la co-culture des CEA en présence de CSM ne modulait pas l'expression de HIF-1 α et de HIF-2 α . La modulation de ces facteurs de transcription passe par des facteurs paracrines sécrétés par les CSM. Sachant que, dans la première étude, la sécrétion de TGF- β était modulée par le rhKGF, d'une manière dose-dépendante, nous pouvons suggérer que, de la même manière, la réduction de l'accumulation de HIF- α soit corrélée à la concentration des facteurs présents dans le milieu conditionné.

Le mc-CSM ayant un effet sur la stabilité de HIF- α totalement opposé dans les cellules A549, une lignée de cellules épithéliales broncho-alvéolaires [Figure 38], nous n'avons pas pu utiliser cette lignée pour une étude fonctionnelle de HIF dans l'apoptose des CEA en hypoxie. Ainsi, afin d'étudier l'implication de la voie HIF, nous avons utilisé un inhibiteur de HIF- α , le YC-1. Cette molécule diminue *in vitro* l'accumulation de la protéine HIF-1 α , en se fixant sur un domaine de dégradation spécifique ([Chun 2001](#), [Kim 2006b](#)), et inhibe également le domaine de transactivation (CAD) de HIF- α ([Li 2008](#)). *In vivo*, le YC-1 inhibe l'angiogenèse

induite par HIF-1 α dans les cellules tumorales ([Yeo 2003](#)). Dans notre étude, l'effet anti-apoptotique du YC-1 est majeur. Cependant, nous n'avons observé aucune diminution de la transcription de Bnip3, gène induit par HIF-1 α bien qu'une baisse de l'expression de la protéine Bnip3 semble se produire (n = 2). Dans notre étude, le YC-1 a peu d'effet sur l'expression de HIF-1 α . Tsui montre que le YC-1 induit une diminution de l'expression de HIF-1 α après 2h d'incubation avec le CoCl₂, une molécule induisant la stabilisation de HIF- α , utilisée comme mimétique de l'hypoxie, mais l'effet du YC-1 ne perdure pas à 24h ([Tsui 2013](#)). Ceci pourrait expliquer que l'on n'observe plus de modulation de la transcription de Bnip3 à 24h, bien que l'expression de la protéine soit diminuée (régulation qui se ferait donc dans les premières heures d'hypoxie). Par ailleurs, des résultats comparables sur Bnip3 ont été obtenus avec le mc-CSMh. Il est donc probable que d'autres facteurs entrent en jeu, afin de limiter l'expression de cette protéine pro-apoptotique.

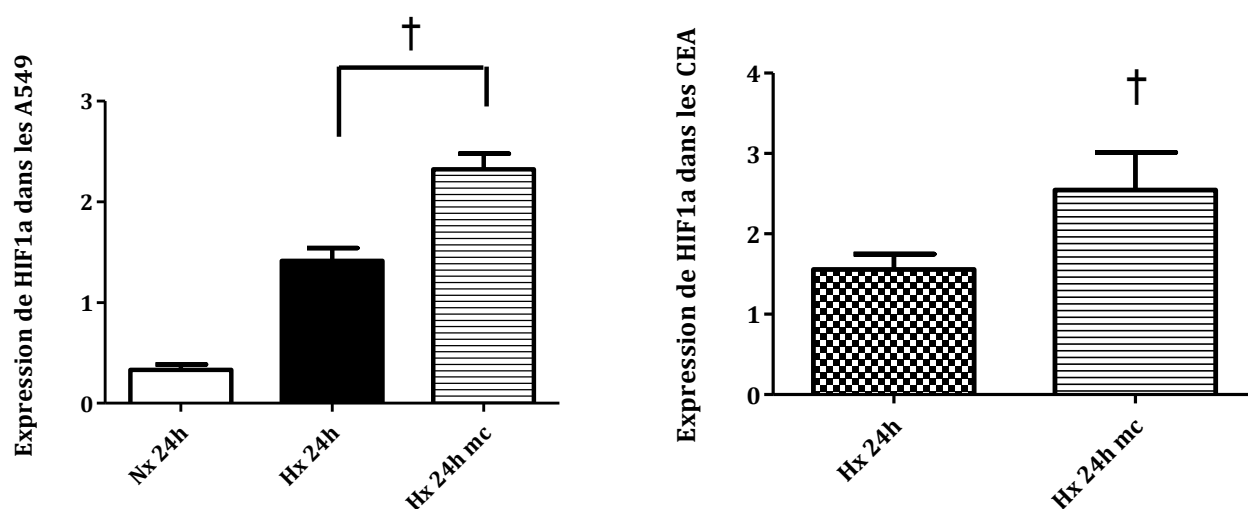


Fig 38. Effet du milieu conditionné sur l'expression de HIF-1 et de HIF-2 dans les A549.

† : significativement différent de la condition hypoxie

† : p < 0.05

Les mécanismes conduisant à la stabilisation de HIF- α par le mc-CSMh restent à définir. Le groupe de Semenza a identifié le récepteur de la protéine kinase C (RACK1), une protéine interagissant avec HIF- α et entraînant sa dégradation par le protéasome de manière O₂ et pVHL-indépendante ([Liu 2007](#)). L'expression de RACK1 est stimulée par le facteur de transcription NF- κ B, lui-même induit par le KGF ([Choi 2003](#), pour revue [Gough 2011](#)). Les

CSM pourraient donc stimuler l'expression de RACK1, induisant ainsi une déstabilisation des facteurs HIF en hypoxie. Par ailleurs, des facteurs de croissance, comme l'IGF ou l'EGF, induisent, via la voie PI3K/Akt, l'expression du facteur de transcription FOXO4, et de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) conduisant à la dégradation de HIF- α de manière pVHL-indépendante ([Tang 2003](#), [Flugel 2007](#)).

Les CSM pourraient d'autre part rétablir la dégradation de HIF en réactivant les PHD. En hypoxie, l'augmentation de l'activité de la kinase diacylglycérol (DGK) participe à l'inhibition de l'activité des PHD ([Aragones 2001](#)). L'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme rétablissant l'accumulation de HIF-1 α , on peut supposer un effet similaire exercé par les facteurs paracrines sécrétés par les CSM ([Temes 2005](#)). D'autre part, l'hypoxie diminue dans les CEA l'activité des superoxydes dismutases (SOD). Le mc-CSMh permet de rétablir leur activité à un taux basal en normoxie, et augmente également fortement l'activité de la catalase en hypoxie. De manière intéressante, la détoxification des ROS par ces enzymes conduit à la production d'oxygène. Cet oxygène pourrait participer à la réactivation partielle des PHD, entraînant ainsi une dégradation partielle des sous-unités HIF- α .

7.4.5. Implication et modulation de la voie des ROS

Notre étude suggère fortement que les CSMh exercent un effet cytoprotecteur anti-apoptotique vis-à-vis des CEA en limitant l'accumulation de ROS en hypoxie. Cet effet passe par une majoration de l'activité d'enzymes antioxydantes, sans modulation de leur expression. Une baisse d'activité en hypoxie a été observée uniquement pour les SOD. Cette diminution pourrait résulter de l'oxydation de certains résidus se trouvant dans le site catalytique. En effet, l'oxydation d'une tyrosine de la SOD2 ou de l'histidine de la SOD1 modifie la conformation du site catalytique, empêchant l'entrée du ligand ([Goldstone 2006](#), [Moreno 2011](#)). De façon intéressante, le mc-CSMh augmente de 20 à 60% l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, GPx et SOD totale) en hypoxie. L'activité SOD mesurée ici regroupe l'activité combinée des formes SOD1 et SOD2. Des données préliminaires indiquent que le mc-CSMh agirait essentiellement en augmentant l'activité de la SOD2 (Dr Florence Jeny et Dr Nicolas Dard, données non publiées). Une stimulation des défenses antioxydantes par les CSM a été mise évidence par d'autres groupes.

Par exemple, l'administration de CSM favorise l'activité de la catalase, des GPx et l'activité SOD totale des tissus hépatiques ou rénaux après ischémie-reperfusion ou dans un modèle de toxicité hépatique ([Zhuo 2013](#), [Burra 2012](#)).

Le mc-CSMh n'ayant aucun effet sur l'expression de ces enzymes anti-oxydantes, la modulation de leurs activités pourrait faire intervenir des modifications post-traductionnelles ou reposer sur l'accès des cofacteurs aux enzymes. Concernant la SOD1, cette enzyme a besoin de former un pont disulfure entre les ions cuivre et zinc. Une protéine chaperonne, la « copper chaperone for SOD » (CCS) permet de faciliter l'apport de cuivre et la formation de la forme active de la SOD1 (pour revue [Furukawa 2006](#)). De façon intéressante, l'ubiquitinylation de la CCS par XIAP stimule son activité, sans induire sa dégradation par le protéasome ([Brady 2010](#)). Ainsi, en induisant l'expression de XIAP, les CSM pourraient stimuler de manière indirecte l'activité superoxyde dismutase.

Concernant la SOD2, son activité est modulée en fonction de son niveau d'acétylation. Cette modification post-traductionnelle touchant notamment la lysine K68, modifie de manière réversible l'accès au site actif de l'enzyme, réduisant l'affinité de l'anion superoxyde et du manganèse pour la SOD2. Une enzyme déacétylase, la sirtuine 3 (Sirt 3), permet ainsi d'augmenter l'activité enzymatique de la SOD2 ([Chen 2011](#)).

Le bon fonctionnement des enzymes anti-oxydantes repose sur le renouvellement de leurs cofacteurs sous forme réduite. Ainsi, l'activité de la GPx est dépendante de son cofacteur, le glutathion, sous forme réduite (GSH). Ce GSH, oxydé lors de la réaction enzymatique de la GPx, est réduit à nouveau grâce à la glutathion réductase (GR), qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction utilisant le NADPH comme cofacteur. Par ailleurs, le NADPH protège l'hème de la catalase de l'oxydation par l' H_2O_2 , causant son inactivation ([Kirkman 1999](#)). Le maintien ou l'augmentation du pool de NADPH semble donc fondamental pour maintenir l'activité de la GR, et donc l'activité de la GPx. L'isocitrate déshydrogénase (ICDH) est une enzyme responsable en grande partie de la production de NADPH. Sa surexpression est corrélée à une augmentation du taux de NADPH, de GSH, à une diminution des dommages liés aux ROS, ainsi qu'à une réduction du taux d'apoptose ([Kim 2007](#)). D'autre part, Sirt3 stimule l'activité de l'ICDH et augmente le pool de NADPH ([Someya 2010](#)).

D'un point de vue cellulaire, il serait intéressant de se pencher plus particulièrement sur les peroxysomes, organelles cytoplasmiques particulièrement présentes dans les CEA. Parmi de nombreuses fonctions métaboliques, les peroxysomes dégradent les ROS grâce aux enzymes

anti-oxydantes qu'elles renferment, telles que la catalase, la SOD1, l'ICDH, des oxydases ou des peroxyrédoxines ([Karnati 2009](#), [Yoshihara 2001](#), pour revue [Walbreccq 2015](#)). La biogénèse et le métabolisme sont altérés dans les fibroblastes de patients atteints de FPI ([Oruçaj 2015](#)). La perte de fonction des peroxysomes pourraient également être avérée dans les CEA en situation d'hypoxie, et prévenue par les CSM.

Ainsi, à plusieurs niveaux, les facteurs présents dans le mc-CSMh sont susceptibles d'améliorer l'activité des enzymes anti-oxydantes, limitant ainsi les dommages cellulaires, et pouvant intervenir sur la voie délétère liée à HIF- α .

Les dommages induits par les ROS perturbent la fonction des organites intracellulaires, dont le réticulum endoplasmique (RE).

7.4.6. Le stress du réticulum endoplasmique

L'accumulation de ROS dans les cellules conduit à une mauvaise conformation des protéines et à leur accumulation au niveau du RE, aboutissant à ce qui est appelé communément un stress du réticulum endoplasmique. La réponse cellulaire à ce stress repose sur l'activation de facteurs de transcription afin de réduire la synthèse protéique et de rétablir l'homéostasie. Cependant, ces facteurs peuvent également induire l'expression de protéines pro-apoptotiques et conduire à la mort des cellules par apoptose.

Au laboratoire, Adnan Naguez a montré que dans les CEA, l'hypoxie était un inducteur fort des voies de réponses « Unfolded Protein Response » (UPR) notamment via l'activation des facteurs ATF4, ATF6 et XBP1. Ces trois facteurs de transcription induisent notamment l'expression de la protéine pro-apoptotique « CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein » (CHOP). CHOP est un facteur de transcription qui stimule l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim, ainsi que le récepteur de mort DR5 ([Puthalakath 2007](#), [Chen 2007](#)). Par ailleurs, CHOP inhibe la transcription du gène codant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ([McCullough 2001](#)). Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent fortement que l'apoptose des CEA induite par l'hypoxie résulte en partie d'un stress du réticulum. En effet, le mc-CSMh empêche l'induction de CHOP et la baisse de Bcl-2 observées en hypoxie.

7.4.7. Rôle paracrine des CSM

A l'instar de l'étude précédente, les CSM exercent des effets bénéfiques sur les CEA en situation d'hypoxie, par un mécanisme paracrine. Les médiateurs impliqués modulent la voie HIF et la voie des ROS, afin de prévenir en partie les effets délétères de l'hypoxie.

Dans l'étude précédente, nous avons discuté de l'effet protecteur du KGF et de son action anti-oxydante. Ce facteur de croissance épithélial joue un rôle anti-apoptotique dans les CEA, notamment en prévenant les dommages liés aux ROS générés par l'hyperoxie ([Buckley 1998](#), [Ray 2003](#)). Nous mettons en avant dans notre étude in vitro l'effet anti-apoptotique du KGF sur les CEA en situation d'hypoxie.

Des études montrent également un effet protecteur du HGF dans différents modèles d'agressions alvéolaires, dont dans des modèles de fibrose induite par la bléomycine ([Yaekashiwa 1997](#), [Dohi 2000](#)). Le rôle du HGF dans la modulation des ROS dans les CEA n'est pas défini. Cependant, dans des cellules épithéliales rénales, le HGF prévient l'apoptose via notamment l'activation de la voie de survie PI3K/Akt ([Yo 1998](#), [Fan 2000](#), [Ozaki 2003](#)). Dans des cellules rénales, le HGF réduit l'apoptose liée à l'accumulation d'H₂O₂, en induisant l'expression de l'hème oxygénase HO-1 ([Radhakrishnan 2005](#)). Enfin, le HGF est susceptible d'induire l'expression d'enzymes anti-oxydantes, comme la SOD1, la catalase, et augmente le ratio GSH/GSSG intracellulaire, en activant les voies PI3K/Akt et NF-κB ([Valdès-Arzate 2009](#)).

L'implication de ces facteurs de croissance épithéliaux dans les voies de signalisation hypoxiques pourrait faire l'objet d'une future étude. Sur la base de la littérature et de nos résultats, on peut fortement supposer leur implication dans la modulation des ROS accumulées en hypoxie.

Une étude sur les voies de signalisation (voie Jnk, PI3K-Akt, MAPK, NF-κB) induites par le KGF ou le HGF serait intéressante à conduire dans les CEA en situation d'hypoxie, afin de mieux comprendre le rôle de ces facteurs de croissance dans la prévention de l'apoptose, et leur implication au niveau de la voie HIF et de la voie des ROS.

8. Discussion générale et perspectives

Afin d'utiliser les CSM ou certains de leurs facteurs sécrétés en thérapie, il est indispensable de comprendre leurs effets sur les cellules saines et malades, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu. Les deux études *in vitro* présentées dans ce mémoire mettent en évidence un effet cytoprotecteur paracrine des CSM humaines vis-à-vis des CEA soumises à un environnement hypoxique. Dans la première étude, nous montrons que l'hypoxie induit une modification phénotypique progressive des CEA au cours de l'hypoxie chronique. La perte de marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux évoque une TEM, d'autant plus que des facteurs de transcription et des médiateurs liés à ce phénomène sont rapidement induits en hypoxie. Dans la deuxième étude, nous avons exploré les voies de signalisation hypoxiques menant à la mort cellulaire des CEA en hypoxie. L'apoptose induite par l'hypoxie repose d'une part sur l'activation de la voie HIF et de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bnip3, et d'autre part sur l'accumulation de ROS, en partie due à une diminution des capacités anti-oxydantes des CEA, et entraînant l'expression rapide de protéines pro-apoptotiques (CHOP), et la répression de l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2). Dans ces deux modèles, un effet bénéfique des CSM sur les CEA a été montré, permettant de prévenir la TEM d'une part et de réduire l'apoptose d'autre part. De manière intéressante, un effet paracrine des CSM est suffisant pour induire cette cytoprotection. La première étude met en évidence l'effet bénéfique du KGF sécrété par les CSM via la modulation de la voie du TGF- β 1 inductrice de TEM. La seconde étude montre une modulation par le milieu conditionné des CSM de deux voies de signalisation induisant l'apoptose en hypoxie, la voie HIF et la voie des ROS, qui dépend au moins en partie du KGF et de l'HGF. La notion de cytoprotection exercée par les CSM sur les CEA agressées apporte un nouvel éclairage conceptuel sur les mécanismes de l'effet bénéfique des CSM observés dans les modèles animaux d'agressions alvéolaires.

L'approche strictement *in vitro* que nous avons utilisée est évidemment réductrice puisque seule la contrainte hypoxique a été étudiée, ce qui est loin de reproduire l'ensemble des désordres observés dans le milieu alvéolaire lors de pathologies complexes telles que le SDRA ou la FPI. Les résultats encourageants observés *in vitro* demandent à être reproduits dans des modèles *in vivo* plus intégrés prenant en compte l'environnement alvéolaire, l'influence des médiateurs sécrétés de manière locale et le dialogue intercellulaire entre les CEA et les cellules voisines. La matrice extra-cellulaire, qui joue un rôle important dans

l'activation du TGF- β , constitue également un paramètre à prendre en compte ([Kim 2006a](#)). A côté de la co-culture de deux types cellulaires in vitro très simplifiée, et des expériences in vivo sur poumons entiers souvent complexes à analyser, il existe une technique permettant de conserver la micro-anatomie du poumon, de préserver en partie le dialogue avec les cellules environnantes, le tout dans une matrice extracellulaire préservée. Cette technique repose sur la culture de tranches de poumon, ou « Precision-Cut Lung Slices » (PCLS). Ces tranches peuvent être étirées afin de reproduire par exemple un modèle de lésions pulmonaires induites par la ventilation, et des techniques couramment utilisées sont adaptables (par exemple les mesures d'apoptose, de stress oxydant...) ([Perlman 2007](#), [Davidovich 2013](#), [Sauer 2014](#)). On peut ainsi envisager de mettre au point avec ce système des modèles d'agression des CEA (par le LPS, par la bléomycine par exemple) permettant de tester de manière plus intégrée l'effet protecteur paracrine et aussi juxtacrine des CSM.

En effet, nous n'avons pour l'instant pas étudié l'effet juxtacrine potentiel des CSM sur les CEA. Or, certains travaux suggèrent que le transfert de matériel cellulaire entre CSM et CEA pourrait intervenir et participer à l'effet protecteur des CSM. Ainsi, Islam a récemment montré que le transfert de mitochondries des CSM vers les CEA dans un modèle expérimental d'agression alvéolaire induite par le LPS d'E. coli permettait d'améliorer l'état énergétique des CEA ([Islam 2012](#)). L'utilisation de co-cultures avec contact cellulaire (de part et d'autre d'un filtre semi-perméable) pourrait également permettre l'étude des mécanismes juxtacrines.

Nos travaux ont permis de mieux comprendre l'effet paracrine des CSM en utilisant une approche de type « médiateur candidat » basée sur les données de la littérature, et se sont focalisés sur deux facteurs de croissance épithéliaux très importants pour les CEA de type II, le KGF et l'HGF. Ces deux facteurs de croissance apparaissent particulièrement intéressants dans le contexte de la FPI où il a été montré un défaut de production d'HGF et de KGF par les fibroblastes du poumon fibrotique avec perturbation du dialogue entre fibroblastes et CEA de type II ([Marchand-Adam 2003](#), [Marchand-Adam 2005](#)). Ainsi, on peut imaginer qu'au cours d'une éventuelle thérapie cellulaire, les CSM exogènes pourraient en quelque sorte pallier la déficience des fibroblastes résidents en termes de production de facteurs de croissance nécessaires au fonctionnement normal des CEA. Toutefois, l'approche « médiateur candidat » est assez réductrice, et il est plus que vraisemblable que les CSM exogènes agissent comme vecteurs de nombreux autres facteurs via leur sécrétome. Dans nos expériences, le KGF et l'HGF sécrétés par les CSM dans le milieu sont en partie responsables des effets paracrines observés, mais lorsqu'ils sont administrés sous forme de protéines recombinantes, aucun de

ces deux facteurs n'est capable de reproduire à lui seul tous les effets du milieu conditionné. Une étude plus globale du sécrétome des CSM en condition de normoxie et d'hypoxie en utilisant des techniques de type Luminex ou des techniques protéomiques serait très utile. L'analyse des sécrétomes de fibroblastes pulmonaires sains et pathologiques (par exemple issu de poumons fibrotiques), leur culture à différents taux d'oxygène, la comparaison avec le sécrétome des CSM, pourraient révéler des médiateurs paracrines important dans la protection phénotypique et physiologique des CEA en situation de stress hypoxique. L'étude de la réparation épithéliale après lésion, en présence ou non de fibroblastes ou de CSM permettrait également d'approfondir nos connaissances sur le dialogue entre ces différents types cellulaires dans la régénération de l'épithélium lésé ([Akram 2013](#)).

Un autre aspect potentiellement intéressant serait l'étude du rôle des microvésicules libérées par les CSM. En effet, le milieu conditionné des CSM est constitué de deux fractions que l'on peut séparer par ultracentrifugations : une fraction non microvésiculaire contenant des facteurs solubles, et une fraction microvésiculaire constituée d'exosomes libérés par des CSM contenant des protéines, des ARNm et des microARN. Ces microvésicules sont susceptibles de fusionner avec les cellules voisines qui incorporent leur contenu ([Bruno 2012](#), [Cantaluppi 2012](#)). Il a été récemment montré dans un modèle murin que l'administration intratrachéale de microvésicules libérées par les CSM humaines limitait l'œdème pulmonaire et l'inflammation induits par l'endotoxine d'E. coli ([Zhu 2014](#)). L'effet bénéfique des microvésicules de CSM était en partie dû au fait qu'elles contenaient des ARNm du KGF susceptibles d'être traduits dans les cellules hôtes, permettant in fine la libération de KGF dans le milieu alvéolaire. Dans des expériences préliminaires (M2 de Rahma Terfous sous la direction du Dr Nicolas Dard, 2015), nous avons observé que la fraction microvésiculaire du milieu conditionné des CSM humaines était capable de limiter l'apoptose des CEA exposées à l'hypoxie, de même que la fraction non microvésiculaire. Le contenu de la fraction microvésiculaire reste à caractériser.

Un des points majeurs de nos études est le fait que les CSM modulent les deux versants de la signalisation hypoxique, la voie HIF d'une part, et la voie des ROS mitochondriaux d'autre part. La voie HIF est activée dans les CEA dans différents modèles animaux d'agression alvéolaire aiguë ([Koury 2004](#), [Feinman 2010](#)) ainsi que dans les CEA de patients atteints de FPI et de souris traitées par la bléomycine ([Tzouvelekis 2007](#), [Weng 2014](#)). Certaines cibles de HIF comme la deoxycytidine kinase (DCK) pourraient jouer un rôle dans la progression de la FPI ([Weng 2014](#)). Dans notre étude sur l'apoptose, il est vraisemblable que l'effet

inhibiteur des CSM sur l'expression de HIF- α soit au moins en partie dû à la diminution de l'accumulation de ROS au cours de l'hypoxie. En effet, nous avons constaté qu'un traitement des CEA hypoxiques par l'anti-oxydant NAC réduisait l'expression de HIF-1 α . La modulation du niveau de ROS par les CSM apparaît donc comme un élément essentiel. Les espèces réactives de l'oxygène sont retrouvées à des taux élevés chez les patients atteints de pneumopathies interstitielles diffuses, ainsi que dans des modèles animaux ([Kuwano 2003](#), pour revue [Kinnula 2008](#), pour revue [Kim 2015](#)). Elles vont induire des dommages directs à la cellule via l'oxydation de l'ADN, la carbonylation des protéines ou la peroxydation des lipides, pouvant amener à l'apoptose cellulaire. D'autre part, les ROS participent à la TEM, notamment en induisant avec HIF- α l'expression de TGF- β ([Zhou 2009](#)). Leur rôle semble nécessaire dans le déclenchement de la TEM en hypoxie ([Felton 2009](#), [Zhou 2009](#)). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les anti-oxydants (NAC ou Euk-134) préviennent la TEM dans les CEA cultivées en hypoxie ou en présence de TGF- β . Sur le plan clinique, l'étude PANTHER-IPF portant sur la thérapie par l'anti-oxydant NAC chez des patients atteints de FPI ne semblait pas apporter d'effet bénéfique ([IPFCRN, Martinez 2014 et al.](#)). Cependant, une étude post-hoc analysant certains marqueurs génétiques a montré que la mutation d'allèles codant TOLLIP et MUC5B, deux acteurs de la réponse immunitaire, affectait la réponse des patients à l'anti-oxydant. Selon leur génotype, les patients ayant reçu de la NAC avaient, comparés aux patients témoins, une probabilité significativement augmentée ou diminuée de survie ([Oldham 2015](#)). Cette sensibilité pourrait intervenir au niveau des CEA, en protégeant ainsi l'épithélium alvéolaire des dommages liés au ROS - dans le cas des patients répondeurs au traitement par l'antioxydant ([Neagos 2015](#)). Des études randomisées sont actuellement en cours pour tester l'effet thérapeutique de la NAC associée à la Pirfénidone. Dans ce contexte, l'effet anti-oxydant paracrine des CSM sur les CEA et éventuellement sur d'autres cellules telles que les fibroblastes pourrait constituer un élément thérapeutique particulièrement important dans les pathologies du poumon profond. Il serait certainement très utile d'explorer les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse anti-oxydante de certains médiateurs libérés par les CSM, comme par exemple le KGF ou l'HGF.

Une des limites concernant l'utilisation des CSM exogènes à visée thérapeutique dans les pathologies du poumon profond chez l'Homme concerne le devenir potentiel de ces CSM sur le site lésionnel qui est mal connu. Nos résultats montrent qu'*in vitro*, l'exposition prolongée des CSM à l'hypoxie ne modifie pas leur phénotype, en particulier n'induit pas de transformation vers un phénotype myofibroblastique, ce qui est plutôt rassurant. *In vivo*,

aucune transformation maligne des CSM dans les différents modèles de pathologies pulmonaires étudiés n'a été rapportée, mais ces études pèchent certainement par leur trop courte durée d'observation. Il semble cependant que la durée de vie des CSM sur le site lésionnel pulmonaire soit relativement courte, de l'ordre de quelques jours tout au plus. Actuellement, l'utilisation des CSM autologues et/ou allogéniques en thérapie cellulaire commence à être testée chez l'Homme au cours du SDRA et de la FPI, essentiellement sous forme d'études cliniques de phase I visant à vérifier la bonne tolérance et la sécurité de l'administration des CSM ([Wilson 2015](#), [Chambers 2014](#)). Les premiers résultats en termes de sécurité sont rassurants, mais il faut maintenant définir précisément le nombre de CSM à administrer et la meilleure voie d'administration. L'utilisation en injection unique de CSM pour traiter le SDRA, une pathologie aiguë de développement brutal et de relativement courte durée d'évolution, paraît logique étant donné la forte mortalité de ce syndrome. L'utilisation des CSM dans le traitement de la FPI est plus problématique car la FPI est une maladie chronique et progressive d'évolution généralement lente. Nos résultats suggèrent qu'il pourrait être particulièrement intéressant d'utiliser les CSM lors des épisodes d'exacerbations aiguës de la maladie, qui comportent une majoration de l'hypoxie alvéolaire et de l'inflammation pulmonaire et qui sont associés à une mortalité élevée. Cependant, il n'est pas certain que l'utilisation de CSM autologues dans la FPI soit appropriée, compte tenu notamment de l'âge avancé des patients atteints de FPI. En effet, il a été montré une variation du profil de sécrétion des CSM selon l'âge des donneurs. La capacité de protection des CSM isolées à partir de patients âgés est diminuée, leurs propriétés anti-inflammatoires et migratoires sont fortement réduites, en partie expliquée par une diminution de l'expression de récepteurs aux chimiokines ([Bustos 2014](#)). Aussi, l'utilisation de CSM allogéniques serait sans doute plus indiquée au cours de la FPI.

En conclusion, ce travail de Thèse contribue à mieux comprendre le rôle de l'hypoxie dans les pathologies du poumon profond et les interactions entre les différents types de cellules alvéolaires, et permet d'approfondir nos connaissances sur les cellules souches mésenchymateuses afin de les utiliser en clinique de la meilleure façon possible, au bénéfice des patients.

9. Références bibliographiques

A

Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1438-49.

ADAMS DH. The effect on mouse-liver catalase activity and blood-haemoglobin level of a milk diet deficient in iron, copper and manganese. *Biochem J*. 1953 May;54(2):328-36.

Adamson IY, Hedgecock C, Bowden DH Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol*. 1990 Aug;137(2):385-92.

Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Dunna NR, Zhan L, Oriowo B, Takeda K, Sanchez JA, Otani H, Maulik G, Fong GH, Maulik N. Disruption of hypoxia-inducible transcription factor-prolyl hydroxylase domain-1 (PHD-1/-) attenuates ex vivo myocardial ischemia/reperfusion injury through hypoxia-inducible factor-1 α transcription factor and its target genes in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 1;15(7):1789-97.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 2001 Dec 3;20(23):6627-36.

Agani F, Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol*. 1998 Nov;54(5):749-54.

Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*. 2007 Oct 25;26(49):6979-88.

Akram KM, Lomas NJ, Forsyth NR, Spiteri MA. Alveolar epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis display upregulation of TRAIL, DR4 and DR5 expression with simultaneous preferential over-expression of pro-apoptotic marker p53. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jan 15;7(2):552-64. eCollection 2014.

Akram KM, Samad S, Spiteri MA, Forsyth NR. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir Res*. 2013 Jan 25;14:9.

Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, Matthay MA, Ware LB. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1783-96.

Aleksandrushkina NI, Vanyushin BF. Endonucleases and apoptosis in animals. *Biochemistry (Mosc)*. 2012 Dec;77(13):1436-51.

Altieri DC1. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. 2010 Sep 1;430(2):199-205.

Álvarez D, Levine M, Rojas M. Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position. *Stem Cells Cloning*. 2015 Apr 15;8:61-5.

Andersson-Sjöland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramírez R, Pardo A, Westergren-Thorsson G, Selman M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2129-40.

Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP, Jirtle RL. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 1993 Jun 3;328(22):1592-8.

Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1990 Oct;86(4):1055-64.

Antunes MA, Laffey JG, Pelosi P, Rocco PR. Mesenchymal stem cell trials for pulmonary diseases. *J Cell Biochem*. 2014 Jun;115(6):1023-32.

Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38458-65.

Aragonés J, Jones DR, Martin S, San Juan MA, Alfranca A, Vidal F, Vara A, Mérida I, Landázuri MO. Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10548-55.

Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirckx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet*. 2008 Feb;40(2):170-80.

ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.

Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007 Mar 29;356(13):1317-26.

Arnesen T, Kong X, Evjenth R, Gromyko D, Varhaug JE, Lin Z, Sang N, Caro J, Lillehaug JR. Interaction between HIF-1 alpha (ODD) and hARD1 does not induce acetylation and destabilization of HIF-1 alpha. *FEBS Lett.* 2005 Nov 21;579(28):6428-32.

Arsalane K, Dubois CM, Muanza T, Bégin R, Boudreau F, Asselin C, Cantin AM. Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Nov;17(5):599-607.

Artaud-Macari E, Goven D, Brayer S, Hamimi A, Besnard V, Marchal-Somme J, Ali ZE, Crestani B, Kerdine-Römer S, Boutten A, Bonay M. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jan 1;18(1):66-79.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967 Aug 12;2(7511):319-23.

Ashino Y, Ying X, Dobbs LG, Bhattacharya J. [Ca(2+)](i) oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Jul;279(1):L5-13.

Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, and Kourembanas S. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1122-1130, 2009.

Aubier M, Crestani B, Fournier M. *Traité de pneumologie 2ème édition 2009*, Mal H, Médecine-Sciences, Flammarion

B

Badri L, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, Peters-Golden M, Toews GB, Pinsky DJ, Krebsbach PH, Lama VN. Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Oct;45(4):809-16.

Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, Kim KW. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 5;324(1):394-400.

Banerjee ER, Laflamme MA, Papayannopoulou T, Kahn M, Murry CE, Henderson WR Jr. Human embryonic stem cells differentiated to lung lineage-specific cells ameliorate pulmonary fibrosis in a xenograft transplant mouse model. *PLoS One.* 2012;7(3):e33165

Bates RC, Mercurio AM. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell.* 2003 May;14(5):1790-800.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313.

Beer HD, Gassmann MG, Munz B, Steiling H, Engelhardt F, Bleuel K, Werner S. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000 Dec;5(1):34-9.

Bellingan GJ1. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax.* 2002 Jun;57(6):540-6.

Bennett D, Fossi A, Bargagli E, Refini RM, Pieroni M, Luzzi L, Ghiribelli C, Paladini P, Voltolini L, Rottoli P. Mortality on the Waiting List for Lung Transplantation in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Single-Centre Experience. *Lung.* 2015 Jul 28.

Birmingham EN, Hesketh JE, Sinclair BR, Koolaard JP, Roy NC5. Selenium-enriched foods are more effective at increasing glutathione peroxidase (GPx) activity compared with selenomethionine: a meta-analysis. *Nutrients.* 2014 Sep 29;6(10):4002-31.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Mar;149(3 Pt 1):818-24.

Bernardi P1. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem.* 1992 May 5;267(13):8834-9.

Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* 2003 Aug 15;22(16):4082-90.

Bersani I, Kunzmann S, Speer CP. Immunomodulatory properties of surfactant preparations. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Jan;11(1):99-110.

Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 31;360(3):646-52.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2214-9.

Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, Gou D, Chintagari NR, Liu L. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway. *J Biol Chem.* 2007 Feb 9;282(6):3968-76.

Bhattacharya J, Matthay MA. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:593-615.

Bi XY, Huang S, Chen JL, Wang F, Wang Y, Guo ZK. Exploration of conditions for releasing microvesicle from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014 Apr;22(2):491-5

Bleier L, Dröse S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov-Dec;1827(11-12):1320-31.

Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*. 2008 Apr;32(4):384-93.

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. 2006 Mar 10;7:14.

Bonnaud P, Georges M, Favrolt N, Camus P. [Drug-induced interstitial lung diseases]. *Rev Prat*. 2014 Sep;64(7):951-6.

Bonnaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, Lavery C, Margetts PJ, Roberts AB, Gauldie J. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):2099-108.

Bonnaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol*. 2005 Oct 15;175(8):5390-5. (B)

Bonnaud P, Mécanismes de la fibrogenèse pulmonaire, *Revue des Maladies Respiratoires* Vol 22, N° 5-C2 - novembre 2005 pp. 101-105. (A)

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1286-92.

Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 Jan;39(11):615-47.

Borok Z, Buhl R, Grimes GJ, Bokser AD, Hubbard RC, Holroyd KJ, Roum JH, Czerski DB, Cantin AM, Crystal RG. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 1991 Jul 27;338(8761):215-6.

Borok Z, Danto SI, Dimen LL, Zhang XL, Lubman RL. Na(+)-K(+)-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 1):L149-58.

Borok Z1, Lubman RL, Danto SI, Zhang XL, Zabski SM, King LS, Lee DM, Agre P, Crandall ED. Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Apr;18(4):554-61.

Bowler RP, Velsor LW, Duda B, Chan ED, Abraham E, Ware LB, Matthay MA, Day BJ. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003 Sep;31(9):2309-15.

Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):341-51.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):7846-54.

Brady GF, Galbán S, Liu X, Basrur V, Gitlin JD, Elenitoba-Johnson KS, Wilson TE, Duckett CS. Regulation of the copper chaperone CCS by XIAP-mediated ubiquitination. *Mol Cell Biol.* 2010 Apr;30(8):1923-36.

Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Kan YW, Werner S. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(15):5492-505.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1337-40.

Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9082-7.

Bruick RK1. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev.* 2003 Nov 1;17(21):2614-23.

Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F; ALIVE Study Group. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med.* 2004 Jan;30(1):51-61.

Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33115.

Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009 May;20(5):1053-67.

Buckley S, Barsky L, Driscoll B, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D. Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am J Physiol.* 1998 May;274(5 Pt 1):L714-20.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):42462-7.

Burra P, Arcidiacono D, Bizzaro D, Chioato T, Di Liddo R, Banerjee A, Cappon A, Bo P, Conconi MT, Parnigotto PP, Mirandola S, Gringeri E, Carraro A, Cillo U, Russo FP. Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury. *BMC Gastroenterol.* 2012 Jul 12;12:88.

Bustos ML, Huleihel L, Kapetanaki MG, Lino-Cardenas CL, Mroz L, Ellis BM, McVerry BJ, Richards TJ, Kaminski N, Cerdene N, Mora AL, Rojas M. Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Apr 1;189(7):787-98.

Butler J, Jayson GG, Swallow AJ. The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1975 Dec 11;408(3):215-22.

C

Calfee CS, Matthay MA, Eisner MD, Benowitz N, Call M, Pittet JF, Cohen MJ. Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jun 15;183(12):1660-5.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):76-83.

Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012 Aug;82(4):412-27.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001 Jun;7(6):259-64.

Card PB, Erbel PJ, Gardner KH. Structural basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization. *J Mol Biol.* 2005 Oct 28;353(3):664-77.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* 1997 Jul 25;90(2):315-23.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998 Jul 30;394(6692):485-90.

Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O, Guichard C, Arbiser JL, Banfi B, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C, Krause KH. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Aug 1;15(3):607-19.

Carnesecchi S, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C. NOX enzymes: potential target for the treatment of acute lung injury. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Jul;69(14):2373-85.

Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol.* 2000 Jan;20(1):402-15.

Castro CY. ARDS and diffuse alveolar damage: a pathologist's perspective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Spring;18(1):13-9.

Chambers DC, Enever D, Ilic N, Sparks L, Whitelaw K, Ayres J, Yerkovich ST, Khalil D, Atkinson KM, Hopkins PM. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology.* 2014 Oct;19(7):1013-8.

Chambers RC, Mercer PF. Mechanisms of alveolar epithelial injury, repair, and fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Mar;12 Suppl 1:S16-20.

Chandel 2015, « Navigating Metabolism », CSH press

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29;95(20):11715-20.

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25130-8.

Chang JC, Summer R, Sun X, Fitzsimmons K, Fine A. Evidence that bone marrow cells do not contribute to the alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Oct;33(4):335-42.

Chapman HA1. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:413-35.

Chen D, Li M, Luo J, Gu W. Direct interactions between HIF-1 α and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):13595-8.

Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):7-10.

Chen L, Tredget EE, Liu C, Wu Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One.* 2009 Sep 22;4(9):e7119.

Chen S, Liu X, Yue P, Schönthal AH, Khuri FR, Sun SY. CHOP-dependant DR5 induction and ubiquitin/proteasome-mediated cellular FLICE-inhibitory protein down-regulation contribute to enhancement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by dimethyl-celecoxib in human non small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2007 Nov;72(5):1269-79.

Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan KL, Zhao S, Xiong Y. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Rep.* 2011 Jun;12(6):534-41.

Chen YX, Zeng ZC, Sun J, Zeng HY, Huang Y, Zhang ZY. Mesenchymal stem cell-conditioned medium prevents radiation-induced liver injury by inhibiting inflammation and protecting sinusoidal endothelial cells. *J Radiat Res.* 2015 Jul;56(4):700-8.

Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):584-95.

Chilosi M, Poletti V, Zamò A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2003 May;162(5):1495-502.

Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB. BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1:S114-27.

Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, Kleeberger SR. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1258-60.

Choi DS, Young H, McMahan T, Wang D, Messing RO. The mouse RACK1 gene is regulated by nuclear factor-kappa B and contributes to cell survival. *Mol Pharmacol*. 2003 Dec;64(6):1541-8.

Chowdhury I, Fisher AB, Christofidou-Solomidou M, Gao L, Tao JQ, Sorokina EM, Lien YC, Bates SR, Feinstein SI. Keratinocyte growth factor and glucocorticoid induction of human peroxiredoxin 6 gene expression occur by independent mechanisms that are synergistic. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 20;20(3):391-402.

Christie JD, Wurfel MM, Feng R, O'Keefe GE, Bradfield J, Ware LB, Christiani DC, Calfee CS, Cohen MJ, Matthay M, Meyer NJ, Kim C, Li M, Akey J, Barnes KC, Sevransky J, Lanken PN, May AK, Aplenc R, Maloney JP, Hakonarson H; Trauma ALI SNP Consortium (TASC) investigators. Genome wide association identifies PPF1A1 as a candidate gene for acute lung injury risk following major trauma. *PLoS One*. 2012;7(1):e28268.

Chun YS, Yeo EJ, Choi E, Teng CM, Bae JM, Kim MS, Park JW. Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells. *Biochem Pharmacol*. 2001 Apr 15;61(8):947-54.

Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS, Hunninghake GW. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Sep;29(3 Pt 1):375-80.

Clerici C, Planès C. Gene regulation in the adaptive process to hypoxia in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Mar;296(3):L267-74.

Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*. 2001 Jul;56(7):549-56.

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympany PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol*. 1997 Mar;150(3):981-91.

Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1267-78.

Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int*. 2010 May;30(5):669-82.

Coraux C, Kileztky C, Polette M, Hinrasky J, Zahm JM, Devillier P, De Bentzmann S, Puchelle E. Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 May;30(5):605-12.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.

Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J*. 2009 Dec 23;425(2):313-25.

Crestani B, Besnard V, Boczkowski J. Signalling pathways from NADPH oxidase-4 to idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Aug;43(8):1086-9.

Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):731-40.

Crestani B, Marchand-Adam S, Quesnel C, Plantier L, Borensztajn K, Marchal J, Mailleux A, Soler P, Dehoux M. Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012 Jul;9(3):158-63.

Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Jun;298(6):L715-31.

D

Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(7):1057-64.

Dagenais A, Boncoeur E, Berthiaume Y. [Na⁺ Transport in the lungs: differential impact of ENaC in the airways and alveoli]. *Med Sci (Paris)*. 2009 Oct;25(10):815-20.

Dagenais A, Fréchette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, Brochiero E, Massé C, Berthiaume Y. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Feb;286(2):L301-11.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med*. 2001 Nov 1;31(9):1075-83.

Dang-Nguyen TQ, Torres-Padilla ME. How cells build totipotency and pluripotency: nuclear, chromatin and transcriptional architecture. *Curr Opin Cell Biol*. 2015 Jun;34:9-15.

Daniels CE, Lasky JA, Limper AH, Mieras K, Gabor E, Schroeder DR; Imatinib-IPF Study Investigators. Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Mar 15;181(6):604-10.

Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero NI, Bizzozero OA. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *ASN Neuro*. 2013;5(1):e00111.

Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S, de Herreros AG. Functional cooperation between SNAIL and TWIST1 in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2011 Apr 8;286(14):12024-32.

Davidovich N, Chhour P, Margulies SS. Uses of Remnant Human Lung Tissue for Mechanical Stretch Studies. *Cell Mol Bioeng*. 2013 Jun 1;6(2):175-182.

Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW, Templeton DJ. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5595-600.

Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, Boomershine CS, Ortiz C, Sherrill TP, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, Lawson WE. TGF β signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Jun;300(6):L887-97.

Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, Lawson WE. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Oct;299(4):L442-52.

DeMaio L, Buckley ST, Krishnaveni MS, Flodby P, Dubourd M, Banfalvi A, Xing Y, Ehrhardt C, Mino P, Zhou B, Crandall ED, Borok Z. Ligand-independent transforming growth factor- β type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol*. 2012 Mar;226(4):633-44.

Deneke SM, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N Engl J Med*. 1980 Jul 10;303(2):76-86.

Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440-8.

Desai LP, Sinclair SE, Chapman KE, Hassid A, Waters CM. High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L769-78.

Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2025-32.

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837-44.

Dobbs LG, Johnson MD. Alveolar epithelial transport in the adult lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007 Dec 15;159(3):283-300.

Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K, Marshall BC. Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Dec;162(6):2302-7.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al . Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315 7.

Dong LH, Jiang YY, Liu YJ, Cui S, Xia CC, Qu C, Jiang X, Qu YQ, Chang PY, Liu F. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Sci Rep.* 2015 Mar 4;5:8713.

d'Ortho MP, Clerici C, Yao PM, Delacourt C, Delclaux C, Franco-Montoya ML, Harf A, Lafuma C. Alveolar epithelial cells in vitro produce gelatinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt 1):L663-75.

Duan C1. Hypoxia-inducible factor 3 biology: Complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 Nov 11;ajpcell.00315.2015.

Duffield JS, Lupper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2013 Jan 24;8:241-76.

Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene.* 1999 Jan 21;18(3):747-57.

Dunsmore SE, Lee YC, Martinez-Williams C, Rannels DE. Synthesis of fibronectin and laminin by type II pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1996 Feb;270(2 Pt 1):L215-23.

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11619-24.

E

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 2006 Oct;7(10):988-94.

Egan JJ, Martinez FJ, Wells AU, Williams T. Lung function estimates in idiopathic pulmonary fibrosis: the potential for a simple classification. *Thorax.* 2005 Apr;60(4):270-3.

Eickelberg O1. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett.* 2001 Sep 28;506(1):11-4.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.

England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep.* 2005;10(5):237-45.

England K, O'Driscoll C, Cotter TG. Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004 Mar;11(3):252-60.

Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL, Ramsgaard L, Richards TJ, Loutaev I, Nawroth PP, Kasper M, Bierhaus A, Oury TD. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2008 Mar;172(3):583-91.

Epa AP, Thatcher TH, Pollock SJ, Wahl LA, Lyda E, Kottmann RM, Phipps RP, Sime PJ. Normal Human Lung Epithelial Cells Inhibit Transforming Growth Factor- β Induced Myofibroblast Differentiation via Prostaglandin E2. *PLoS One.* 2015 Aug 6;10(8):e0135266.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):43-54.

Essig DA, Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol.* 1997 Oct;22(5):409-28.

Evans JH and Sanderson MJ. Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 277: L30–L41, 1999.

F

Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2;363(23):2233-47.

Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM. The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene.* 2000 Apr 27;19(18):2212-23.

Fang HY, Lin CY, Chow KC, Huang HC, Ko WJ. Microarray detection of gene overexpression in primary spontaneous pneumothorax. *Exp Lung Res.* 2010 Aug;36(6):323-30.

Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, Dolganov G, Verkman AS, Matthay MA. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L242–L249, 2006.

Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, Fusco A, Caorsi C, Deregibus MC, Bruno S, Amoroso A, Giovarelli M, Porta M, Perin PC, Tetta C, Camussi G, Zanone MM. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014 Aug;57(8):1664-73.

Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, Müller M, Mason RJ. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J*. 1999 Sep;14(3):534-44.

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007 Dec;6(6):745-57.

Feinman R, Deitch EA, Watkins AC, Abungu B, Colorado I, Kannan KB, Sheth SU, Caputo FJ, Lu Q, Ramanathan M, Attan S, Badami CD, Doucet D, Barlos D, Bosch-Marce M, Semenza GL, Xu DZ. HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Oct;299(4):G833-43.

Felton VM, Borok Z, Willis BC. N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Nov;297(5):L805-12.

Fernandez Perez ER, Daniels CE, Schroeder DR, St Sauver J, Hartman TE, Bartholmai BJ, Yi ES, Ryu JH. Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest* 2010 Jan;137(1):129-37.

Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med*. 2006 Jan;12(1):99-106.

Fine A, Anderson NL, Rothstein TL, Williams MC, Gochuico BR. Fas expression in pulmonary alveolar type II cells. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 1):L64-71.

Fine A, Goldstein RH. The effect of PGE2 on the activation of quiescent lung fibroblasts. *Prostaglandins*. 1987 Jun;33(6):903-13.

Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E2 on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 1989 Oct 15;264(29):16988-91.

Finger EC, Cheng CF, Williams TR, Rankin EB, Bedogni B, Tachiki L, Spong S, Giaccia AJ, Powell MB. CTGF is a therapeutic target for metastatic melanoma. *Oncogene*. 2014 Feb 27;33(9):1093-100.

Flaherty KR, Toews GB, Lynch JP 3rd, Kazerooni EA, Gross BH, Strawderman RL, Hariharan K, Flint A, Martinez FJ. Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective assessment of adverse reactions, response to therapy, and survival. *Am J Med*. 2001 Mar;110(4):278-82.

Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007 May;27(9):3253-65.

Folkesson HG, Matthay MA, Weström BR, Kim KJ, Karlsson BW, Hastings RH. Alveolar epithelial clearance of protein. *J Appl Physiol* (1985). 1996 May;80(5):1431-45.

Fowler AA, Fisher BJ, Centor RM, Carchman RA. Development of the adult respiratory distress syndrome: progressive alteration of neutrophil chemotactic and secretory processes. *Am J Pathol*. 1984 Sep;116(3):427-35.

Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, Howard M, Canessa CM, Fang X, Sheppard D, Matthay MA, Pittet JF. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2003 Nov 7;278(45):43939-50.

Frank S, Munz B, Werner S. The human homologue of a bovine non-selenium glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene. *Oncogene*. 1997 Feb 27;14(8):915-21.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002; 196:459-468.

Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Mar;80(6):1521-5.

Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol*. 1987 Jan;126(1):171-82.

Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb 1;11(2):109-24.

Furukawa Y, O'Halloran TV. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2006 May-Jun;8(5-6):847-67.

G

Galani V, Tatsaki E, Bai M, Kitsoulis P, Lekka M, Nakos G, Kanavaros P. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. *Pathol Res Pract*. 2010 Mar 15;206(3):145-50.

Galiacy S, Planus E, Lepetit H, Féréol S, Laurent V, Ware L, Isabey D, Matthay M, Harf A, d'Ortho MP. Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro. *Exp Cell Res*. 2003 Feb 15;283(2):215-29.

Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 13;321(1):102-8.

Gao, L. and K. C. Barnes (2009). "Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(5): L713-725.

Garcia O, Carraro G, Navarro S, Bertonecello I, McQualter J, Driscoll B, Jesudason E, Warburton D. Cell-based therapies for lung disease. *Br Med Bull*. 2012;101:147-61

Garcia-Sancho, C., I. Buendia-Roldan, et al. (2011). "Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." *Respir Med* 105(12): 1902-1907.

Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 2nd edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co; 2001.

Gates S, Perkins GD, Lamb SE, Kelly C, Thickett DR, Young JD, McAuley DF, Snaith C, McCabe C, Hulme CT, Gao Smith F. Beta-Agonist Lung injury Trial-2 (BALTI-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and economic evaluation of intravenous infusion of salbutamol versus placebo in patients with acute respiratory distress syndrome. *Health Technol Assess*. 2013 Sep;17(38):v-vi, 1-87.

Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouysségur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):781-94.

Ginsberg SJ, Comis RL. The pulmonary toxicity of antineoplastic agents. *Semin Oncol*. 1982 Mar;9(1):34-51.

Glavan BJ, Holden TD, Goss CH, Black RA, Neff MJ, Nathens AB, Martin TR, Wurfel MM; ARDSnet Investigators. Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 1;183(3):356-63.

Glennie, S. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821–2827

Goldstone AB, Liochev SI, Fridovich I. Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H₂O₂: mechanism of protection. *Free Radic Biol Med*. 2006 Dec 15;41(12):1860-3.

Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, Dard N, Planès C, Matthay MA, Clerici C. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jun 1;306(11):L975-85.

Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis*. 2011 Oct 6;2:e213.

Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W, Hänze J. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 15;36(10):1279-88.

Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene*. 2005 Apr 28;24(19):3110-20.

Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1127-30.

Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Dec;160(6):1843-50.

Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):1976-81.

Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004 Oct;57(10):1009-14.

Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJ, West J, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax*. 2006 Nov;61(11):980-5.

Grinberg L, Fibach E, Amer J, Atlas D. N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jan 1;38(1):136-45.

Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep;8(3):171-9.

Gu P, Luo B, Yi X, Zhu H, Li S, Yu X, Han F, Zhang S, Zhu X, Rui W, Qiu W, Fan D. The expressions and meanings of BMP-7 and TGF- β in idiopathic pulmonary fibrosis and idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2014 Sep;37(9):664-70.

Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, Nelson S. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1777-84.

Gumbiner BM, Kim NG. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *J Cell Sci*. 2014 Feb 15;127(Pt 4):709-17.

Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, Yu KT, Jaye M, Ivashchenko Y. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*. 2001 Apr;8(4):367-76.

Guo Y, Martinez-Williams C, Rannels DE. Gap junction-microtubule associations in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Dec;285(6):L1213-21.

Guppy, M. and Withers, P. (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 74, 1–40.

Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1855-63.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*. 2005 Jun;1(6):401-8.

Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 2006 Sep;91(5):807-19.

H

Haase VH. Pathophysiological Consequences of HIF Activation: HIF as a modulator of fibrosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Oct;1177:57-65.

Hackenbeck T, Huber R, Schietke R, Knaup KX, Monti J, Wu X, Klanke B, Frey B, Gaip U, Wullich B, Ferbus D, Goubin G, Warnecke C, Eckardt KU, Wiesener MS. The GTPase RAB20 is a HIF target with mitochondrial localization mediating apoptosis in hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1813(1):1-13.

Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6470-8.

Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Dec;21(6):894-9.

Han F, Luo Y, Li Y, Liu Z, Xu D, Jin F, Li Z. Seawater induces apoptosis in alveolar epithelial cells via the Fas/FasL-mediated pathway. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Jul 1;182(2-3):71-80.

Hanson ES, Rawlins ML, Leibold EA. Oxygen and iron regulation of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40337-42.

Harada T, Nabeshima K, Hamasaki M, Uesugi N, Watanabe K, Iwasaki H. Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry. *Pathol Int*. 2010 Jan;60(1):14-21.

Hastings RH, Grady M, Sakuma T, Matthay MA. Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Oct;73(4):1310-6.

Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med*. 2014 Apr 9;6(231):231ra47.

Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett.* 2012 Jul 4;586(14):1959-70.

Heppleston AG. Pulmonary toxicology of silica, coal and asbestos. *Environ Health Perspect.* 1984 Apr;55:111-27.

Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Nov;15(5):624-32.

Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Dec;287(6):F1223-32.

Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3810-20.

Hilberg O, Simonsen U, du Bois R, Bendstrup E. Pirfenidone: significant treatment effects in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J.* 2012 Jul;6(3):131-43.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1807-16.

Hirohata S, Yanagida T, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Bone marrow CD34+ progenitor cells stimulated with stem cell factor and GM-CSF have the capacity to activate IgD- B cells through direct cellular interaction. *J Leukoc Biol.* 2002 Jun;71(6):987-95.

Hirsilä M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J.* 2005 Aug;19(10):1308-10.

Hlaing KH, Clément MV. Formation of protein S-nitrosylation by reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 2014 Sep;48(9):996-1010.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):1030-41.

Horsburgh MJ, Wharton SJ, Karavolos M, Foster SJ. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol.* 2002 Nov;10(11):496-501.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.

Hou, T., Xu, J., Wu, X., Xie, Z., Luo, F., Zhang, Z. and Zeng, L. (2009) Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering *Tissue Eng. Part A* 15, 2325–2334.

Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, et al. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol*. 1991 Nov 1;147(9):2964-9.

Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell*. 2007 Nov;18(11):4528-42.

Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K, Toh I, Goldstein BJ, Woolkalis M, Sharma K. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Oct;289(4):F816-25.

Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39792-800.

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996 Dec 13;271(50):32253-9.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):7987-92.

Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Van Ta Q, Kim M, Oh YM, Lee YS, Lee SD. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Sep;301(3):L255-66.

Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):85-97.

Hung SP, Ho JH, Shih YR, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2012 Feb;30(2):260-6.

I

Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE Jr, Raghu G. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014 May 29;370(22):2093-101.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2012 May 24;366(21):1968-77.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Zisman DA, Schwarz M, Anstrom KJ, Collard HR, Flaherty KR, Hunninghake GW. A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2010 Aug 12;363(7):620-8.

Impellizzeri D, Talero E, Siracusa R, Alcaide A, Cordaro M, Maria Zubelia J, Bruschetta G, Crupi R, Esposito E, Cuzzocrea S, Motilva V. Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis in mice. *Br J Nutr*. 2015 Sep;114(6):853-65.

Inomata M, Kamio K, Azuma A, Matsuda K, Kokuho N, Miura Y, Hayashi H, Nei T, Fujita K, Saito Y, Gemma A. Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2014 Feb 8;15:16.

Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F., and Neckers, L.M. (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J. Biol. Chem*. 277, 29936–29944.

Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*. 2012 Apr 15;18(5):759-65.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):341-50.

Iyer SN, Wild JS, Schiedt MJ, Hyde DM, Margolin SB, Giri SN. Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *J Lab Clin Med*. 1995 Jun;125(6):779-85.

Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K. BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jan;290(1):L120-6.

J

Jayachandran A, Königshoff M, Yu H, Rupniewska E, Hecker M, Klepetko W, Seeger W, Eickelberg O. SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis. *Thorax*. 2009 Dec;64(12):1053-61.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002 Nov 27;111(5):709-20.

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*. 2001 May;15(7):1312-4.

Jiang Y, Dai A, Li Q, Hu R. Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007 Jan;39(1):73-80.

Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, Jurukovski V, Erickson AC, Walian PJ, Taylor SE, Ledbetter S, Lawrence CM, Rifkin DB, Barcellos-Hoff MH. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiat Res.* 2006 Dec;166(6):839-48.

Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tighe Z, Jain L, Dobbs LG, Eaton DC. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 28;103(13):4964-9.

Juarez MM, Chan AL, Norris AG, Morrissey BM, Albertson TE. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis—a review of current and novel pharmacotherapies. *J Thorac Dis.* 2015 Mar;7(3):499-519.

Jung HJ, Kim JH, Shim JS, Kwon HJ. A novel Ca²⁺/calmodulin antagonist HBC inhibits angiogenesis and down-regulates hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2010 Aug 13;285(33):25867-74.

K

Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008 May 23;30(4):393-402.

Kajstura J, Rota M, Hall SR, Hosoda T, D'Amario D, Sanada F, Zheng H, Ogórek B, Rondon-Clavo C, Ferreira-Martins J, Matsuda A, Arranto C, Goichberg P, Giordano G, Haley KJ, Bardelli S, Rayatzadeh H, Liu X, Quaini F, Liao R, Leri A, Perrella MA, Loscalzo J, Anversa P. Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med.* 2011 May 12;364(19):1795-806.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8.

Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(4):293-315.

Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* 2003 Apr;11(4):915-26.

Kangelaris KN, Sapru A, Calfee CS, Liu KD, Pawlikowska L, Witte JS, Vittinghoff E, Zhuo H, Auerbach AD, Ziv E, Matthay MA; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. The association between a Darc gene polymorphism and clinical outcomes in African American patients with acute lung injury. *Chest.* 2012 May;141(5):1160-9.

Kao WW, Prockop DJ. Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations. *Nature.* 1977 Mar 3;266(5597):63-4.

Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Dec;152(6 Pt 1):2163-9.

Karnati S, Baumgart-Vogt E. Peroxisomes in airway epithelia and future prospects of these organelles for pulmonary cell biology. *Histochem Cell Biol.* 2009 Apr;131(4):447-54.

Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res.* 2005 Jun 9;6:56.

Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 Jul 14;275(28):21094-8.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1365-75.

Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, Matsuba T, Kunitake R, Tanaka T, Maeyama T, Hara N. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol.* 2000 Aug;157(2):597-603.

Keating A1. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012 Jun 14;10(6):709-16.

Kemp PJ, Kim KJ, Borok Z, Crandall ED. Re-evaluating the Na(+) conductance of adult rat alveolar type II pneumocytes: evidence for the involvement of cGMP-activated cation channels. *J Physiol.* 2001 Nov 1;536(Pt 3):693-701.

Kendall RT, Feghali-Bostwick CA1. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014 May 27;5:123.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.

Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Itoh K, Yamamoto M, Hizawa N. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respir Res.* 2010 Mar 18;11:31.

Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 6;102(49):17545-50.

Kim HJ, Henke CA, Savik SK, Ingbar DH. Integrin mediation of alveolar epithelial cell migration on fibronectin and type I collagen. *Am J Physiol.* 1997 Jul;273(1 Pt 1):L134-41.

Kim HJ, Ingbar DH, Henke CA. Integrin mediation of type II cell adherence to provisional matrix proteins. *Am J Physiol.* 1996 Aug;271(2 Pt 1):L277-86.

Kim HL, Yeo EJ, Chun YS, Park JW. A domain responsible for HIF-1alpha degradation by YC-1, a novel anticancer agent. *Int J Oncol.* 2006 Jul;29(1):255-60. B

Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim DW. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):839-49.

Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):113-24.

Kim JY, Cho JJ, Ha J, Park JH. The carboxy terminal C-tail of BNip3 is crucial in induction of mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Feb 15;398(2):147-52.

Kim JY, Kim YJ, Lee S, Park JH. BNip3 is a mediator of TNF-induced necrotic cell death. *Apoptosis*. 2011 Feb;16(2):114-26.

Kim KJ, Malik AB. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Feb;284(2):L247-59.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 29;103(35):13180-5. A

Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):213-24. A

Kim MJ, Ryu JC, Kwon Y, Lee S, Bae YS, Yoon JH, Ryu JH. Dual oxidase 2 in lung epithelia is essential for hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Nov 1;21(13):1803-18.

Kim SJ, Cheres P, Jablonski RP, Williams DB, Kamp DW. The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep 7;16(9):21486-519.

Kim SJ, Yune TY, Han CT, Kim YC, Oh YJ, Markelonis GJ, Oh TH. Mitochondrial isocitrate dehydrogenase protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress. *J Neurosci Res*. 2007 Jan;85(1):139-52.

Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, Jackson AL, Nikolinakos P, Ospina B, Naumov G, Brandstetter KA, Weigman VJ, Zaghlul S, Hayes DN, Padera RF, Heymach JV, Kung AL, Sharpless NE, Kaelin WG Jr, Wong KK. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2160-70. (B)

King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Hormel P, Lancaster L, Noble PW, Sahn SA, Szwarcberg J, Thomeer M, Valeyre D, du Bois RM; INSPIRE Study Group. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009 Jul 18;374(9685):222-8.

King, T. E., Jr., A. Pardo, et al. (2011). "Idiopathic pulmonary fibrosis." *Lancet* 378(9807): 1949-1961.

Kinnula VL, Chang L, Everitt JJ, Crapo JD. Oxidants and antioxidants in alveolar epithelial type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol*. 1992 Jan;262(1 Pt 1):L69-77.

Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Aug 15;172(4):417-22.

Kinnula VL, Myllärniemi M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Apr;10(4):727-38.

Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*. 1999 May 14;274(20):13908-14.

Kivirikko KI, Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol*. 1998 Feb;16(7):357-68.

Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res*. 2003 Apr 15;63(8):1764-8.

Kobayashi S, Kondo S, Juni K. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm Res*. 1995 Aug;12(8):1115-9.

Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1257-63.

Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1529-36.

Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J. Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*. 2006 Mar;26(6):2019-28.

Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Oct;33(4):328-34.

Koury J, Deitch EA, Homma H, Abungu B, Gangurde P, Condon MR, Lu Q, Xu DZ, Feinman R. Persistent HIF-1alpha activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide. *Shock*. 2004 Sep;22(3):270-7.

Kovacs D, Raffa S, Flori E, Aspate N, Briganti S, Cardinali G, Torrisi MR, Picardo M. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J Dermatol Sci*. 2009 May;54(2):106-13.

Koval M. Keratinocyte growth factor improves alveolar barrier function: keeping claudins in line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Dec;299(6):L721-3.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101: 3722–9

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001 May 4;105(3):369-77.

Krebs HA, Johnson WA. The role of citric acid in an intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 1937 / 4: 148-156

Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Mar;24(3):224-34.

Krick S, Eul BG, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 May;32(5):395-403.

Krokan H, Grafstrom RC, Sundqvist K, Esterbauer H, Harris CC. Cytotoxicity, thiol depletion and inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by various aldehydes in cultured human bronchial fibroblasts. *Carcinogenesis*. 1985 Dec;6(12):1755-9.

Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïm A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*. 2007 Oct 1;204(10):2407-22.

Kubes P. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation*. 1995 Sep;2(3):235-44.

Kubli DA, Quinsay MN, Huang C, Lee Y, Gustafsson AB. Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Nov;295(5):H2025-31.

Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J*. 2007 Aug 1;405(3):407-15.

Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol*. 1991 May;138(5):1257-65.

Kumar KV, Rao SM, Gayani R, Mohan IK, Naidu MU. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clin Chim Acta*. 2000 Aug;298(1-2):111-20.

Kuwano K, Miyazaki H, Hagimoto N, Kawasaki M, Fujita M, Kunitake R, Kaneko Y, Hara N. The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jan;20(1):53-60.

Kuwano K, Nakashima N, Inoshima I, Hagimoto N, Fujita M, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Watanabe K, Hara N. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J.* 2003 Feb;21(2):232-40.

Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belezmezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014 Nov 26;6(5):552-70.

L

Lama V, Moore BB, Christensen P, Toews GB, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Dec;27(6):752-8.

Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med.* 1999 Sep;27(9):1738-44.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar;15(3):178-96.

Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen YB, Hsieh CH, Kuo HP, Chong KY. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther.* 2015 May 20;6:97.

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002 Jun 15;16(12):1466-71.

Larghero J, Vija L, Lecourt S, Michel L, Verrecchia F, Farge D. [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. *Rev Med Interne.* 2009 Mar;30(3):287-99.

Lee E, Yim S, Lee SK, Park H. Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol Cells.* 2002 Aug 31;14(1):9-15.

Lee JS, Collard HR, Anstrom KJ, et al. Anti-acid treatment and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of data from three randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 369–376. A

Lee JW, Fang X, Dolganov G, Fremont RD, Bastarache JA, Ware LB, Matthay MA. Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):24109-19.

Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16357-62. A

Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells*. 2011 Jun;29(6):913-9.

Lee JW, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Oct;9(10):1259-70. B

Lee JW, Krasnodembskaya A, McKenna DH, Song Y, Abbott J, Matthay MA. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in ex vivo human lungs injured with live bacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Apr 1;187(7):751-60. B

Lee KH, Park JW, Chun YS. Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1alpha isoform. *Nucleic Acids Res*. 2004 Oct 12;32(18):5499-511.

Lee KS, Choi YH, Kim YS, Baik SH, Oh YJ, Sheen SS, Park JH, Hwang SC, Park KJ. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients with regard to apoptosis. *Respir Med*. 2008 Mar;102(3):464-9.

Lee Y, Kubli DA, Hanna RA, Cortez MQ, Lee HY, Miyamoto S, Gustafsson ÅB. Cellular redox status determines sensitivity to BNIP3-mediated cell death in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015 Jun 15;308(12):C983-92.

Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L, Maier KL. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J*. 1999 Jan;13(1):169-74.

Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Jan;147(1):218-33.

Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 15;183(4):431-40.

Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Li CY. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*. 2007 Apr 13;26(1):63-74.

Li JW, Wu X. Mesenchymal stem cells ameliorate LPS-induced acute lung injury through KGF promoting alveolar fluid clearance of alveolar type II cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Jul;19(13):2368-78.

Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1alpha. *Cell Res*. 2006 Jun;16(6):548-58.

Li SH, Shin DH, Chun YS, Lee MK, Kim MS, Park JW. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1{alpha}. *Mol Cancer Ther*. 2008 Dec;7(12):3729-38.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010 Jun;25(6):807-15.

Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):642-9.

Liu Y, Liu Y, Yan X, Xu Y, Luo F, Ye J, Yan H, Yang X, Huang X, Zhang J, Ji G. HIFs enhance the migratory and neoplastic capacities of hepatocellular carcinoma cells by promoting EMT. *Tumour Biol*. 2014 Aug;35(8):8103-14.

Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L, Yi M, Stephens RM, Seng V, Sheppard-Tillman H, Martin P, Kelly K. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene*. 2013 Jan 17;32(3):296-306.

Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*. 2007 Mar 15;6(6):656-9.

Lo DJ, Farris AB, Song M, Leopardi F, Anderson DJ, Strobert EA, Ramakrishnan S, Turgeon NA, Mehta AK, Turnbull B, Maroni B, Violette SM, Kirk AD. Inhibition of $\alpha\beta6$ promotes acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Am J Transplant*. 2013 Dec;13(12):3085-93.

Lomas NJ, Watts KL, Akram KM, Forsyth NR, Spiteri MA. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(1):58-71.

Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1:S2-19.

Lu Y, Pan ZZ, Devaux Y, Ray P. p21-activated protein kinase 4 (PAK4) interacts with the keratinocyte growth factor receptor and participates in keratinocyte growth factor-mediated inhibition of oxidant-induced cell death. *J Biol Chem*. 2003 Mar 21;278(12):10374-80.

Luo D, Wang J, Li J, Post M. Mouse snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res*. 2011 Feb;9(2):234-45.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014 Jun;32(6):1408-19.

M

Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):247-56. B

Ma X, Xu D, Ai Y, Ming G, Zhao S. Fas inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis and cytokine release of rat type II alveolar epithelial cells. *Mol Biol Rep*. 2010 Oct;37(7):3051-6. A

Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Mar;21(3):321-6.

Mahajan S, Dammai V, Hsu T, Kraft AS. Hypoxia-inducible factor-2alpha regulates the expression of TRAIL receptor DR5 in renal cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008 Sep;29(9):1734-41.

Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Jul 1;182(1):73-82.

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001 Oct 15;15(20):2675-86.

Maier K, Leuschel L, Costabel U. Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Feb;143(2):271-4.

Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, Nangaku M. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):871-80.

Marchand-Adam S, Marchal J, Cohen M, Soler P, Gerard B, Castier Y, Lesèche G, Valeyre D, Mal H, Aubier M, Dehoux M, Crestani B. Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Nov 15;168(10):1156-61.

Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, Legrand A, Cohen M, Marchal J, Soler P, Lesèche G, Mal H, Aubier M, Dehoux M, Crestani B. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 May;32(5):470-7.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.

Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, Laurent GJ. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax.* 2000 Feb;55(2):143-6.

Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LC Jr. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(19):6033-7.

Masson N, Singleton RS, Sekirnik R, Trudgian DC, Ambrose LJ, Miranda MX, Tian YM, Kessler BM, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep.* 2012 Mar 1;13(3):251-7.

Matalon S, Holm BA, Baker RR, Whitfield MK, Freeman BA. Characterization of antioxidant activities of pulmonary surfactant mixtures. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Aug 17;1035(2):121-7.

Matalon S, O'Brodivich H. Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:627-61.

Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Feb;32(2):157-70.

Matsushita N, Sogawa K, Ema M, Yoshida A, Fujii-Kuriyama Y. A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J Biol Chem*. 1993 Oct 5;268(28):21002-6.

Matsuzawa Y, Kawashima T, Kuwabara R, Hayakawa S, Irie T, Yoshida T, Rikitake H, Wakabayashi T, Okada N, Kawashima K, Suzuki Y, Shirai K. Change in serum marker of oxidative stress in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015 Jun;32:1-6.

Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev*. 2002 Jul;82(3):569-600.

Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:147-63.

Matthay MA1. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jun 1;189(11):1301-8.

Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Dec;156(6):1969-77.

Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC. Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):153-61.

Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11032-40.

McAnulty RJ, Chambers RC, Laurent GJ. Regulation of fibroblast procollagen production. Transforming growth factor-beta 1 induces prostaglandin E2 but not procollagen synthesis via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 (Pt 1):63-8.

McClatchey AI, Yap AS. Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Oct;24(5):685-94.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(4):1249-59.

McGowan SE. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J*. 1992 Aug;6(11):2895-904.

McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME, Schoene RB, Maunder RJ, Hudson LD. Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jul;150(1):90-4.

Menrad H, Werno C, Schmid T, Copanaki E, Deller T, Dehne N, Brüne B. Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):2183-92.

Merchant RK, Peterson MW, Hunninghake GW. Silica directly increases permeability of alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Apr;68(4):1354-9.

Meyer NJ, Li M, Feng R, Bradfield J, Gallop R, Bellamy S, Fuchs BD, Lanken PN, Albelda SM, Rushefski M, Aplenc R, Abramova H, Atochina-Vasserman EN, Beers MF, Calfee CS, Cohen MJ, Pittet JF, Christiani DC, O'Keefe GE, Ware LB, May AK, Wurfel MM, Hakonarson H, Christie JD. ANGPT2 genetic variant is associated with trauma-associated acute lung injury and altered plasma angiopoietin-2 isoform ratio. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 May 15;183(10):1344-53.

Milosevic J, Pandit K, Magister M, Rabinovich E, Ellwanger DC, Yu G, Vuga LJ, Weksler B, Benos PV, Gibson KF, McMillan M, Kahn M, Kaminski N. Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Dec;47(6):879-87.

Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1095-103.

Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest*. 1998 May 1;101(9):1827-34.

Mizuno S, Matsumoto K, Li MY, Nakamura T. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):580-2.

Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, Boyd R, Trounson A. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol* 2009; 175: 303–313

Moreno DM, Martí MA, De Biase PM, Estrin DA, Demicheli V, Radi R, Boechi L. Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Mar 15;507(2):304-9.

Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 20;379(4):1114-9.

Moriwaki Y, Yamamoto T, Yamaguchi K, Takahashi S, Higashino K. Immunohistochemical localization of aldehyde and xanthine oxidase in rat tissues using polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol.* 1996 Jan;105(1):71-9.

Moss M, Burnham EL. Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2003 Apr;31(4 Suppl):S207-12.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):319-28.

Murray JF. 1986. Ventilation. In *The normal lung (The basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease)* (ed. Murray JF), pp. 114 –117. W.B. Saunders, Philadelphia

Muscudere JG, Mullen JB, Gan K, Slutsky AS. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 May;149(5):1327-34.

N

Nakamura T, Fujiwara N, Sato E, Kawagoe Y, Ueda Y, Yamada S, Koide H. Effect of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion on serum high mobility group box-1 protein levels and oxidative stress in patients with acute respiratory distress syndrome. *ASAIO J.* 2009 Jul-Aug;55(4):395-9.

Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* 2008 Jan 16;82(3-4):210-7.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007 Nov 15;110(10):3499-506.

Neagos J, Standiford TJ, Newstead MW, Zeng X, Huang SK, Ballinger MN. Epigenetic Regulation of Tolerance to TLR Ligands in Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015 May 12.

Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1125-71.

Nichols JE, Niles J, Riddle M, Vargas G, Schilagard T, Ma L, Edward K, La Francesca S, Sakamoto J, Vega S, Ogadegbe M, Mlcak R, Deyo D, Woodson L, McQuitty C, Lick S, Beckles D, Melo E, Cortiella J. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2013 Sep;19(17-18):2045-62.

Nielepkowicz-Goździńska A, Fendler W, Robak E, Kulczycka-Siennicka L, Górski P, Pietras T, Brzeziańska E, Pietrusińska M, Antczak A. The Role of CXC Chemokines in Pulmonary Fibrosis of Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Aug 15.

Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1549-61.

Nieto MA The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Mar;3(3):155-66.

Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:347-76.

Nishioka A, Ogawa Y, Mima T, Jin YJ, Sonobe H, Kariya S, Kubota K, Yoshida S, Ueno H. Histopathologic amelioration of fibroproliferative change in rat irradiated lung using soluble transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediated by adenoviral vector. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Mar 15;58(4):1235-41.

Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Szwarberg J, Valeyre D, du Bois RM; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011 May 21;377(9779):1760-9.

Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med*. 2001 Feb 22;344(8):573-9.

Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int*. 2000 Dec;58(6):2351-66.

Noth I, Anstrom KJ, Calvert SB, de Andrade J, Flaherty KR, Glazer C, Kaner RJ, Olman MA; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network (IPFnet). A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jul 1;186(1):88-95.

Noth I, Zhang Y, Ma SF, Flores C, Barber M, Huang Y, Broderick SM, Wade MS, Hysi P, Scurba J, Richards TJ, Juan-Guardela BM, Vij R, Han MK, Martinez FJ, Kossen K, Seiwert SD, Christie JD, Nicolae D, Kaminski N, Garcia JG. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2013 Jun;1(4):309-17.

Nyström T1. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*. 2005 Apr 6;24(7):1311-7.

O

O'Dwyer DN, Armstrong ME, Trujillo G, Cooke G, Keane MP, Fallon PG, Simpson AJ, Millar AB, McGrath EE, Whyte MK, Hirani N, Hogaboam CM, Donnelly SC. The Toll-like receptor 3 L412F polymorphism and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Dec 15;188(12):1442-50.

Oh E, Siddiqui N, Worringer E, Schroeder K, Markowiak S, Alrehaili M, Safi F, Hinch BT, Assaly R. Acute amiodarone-induced lung toxicity. *Am J Med Sci*. 2015 Jan;349(1):89.

Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Repair of segmental long bone defect by composite graft of marrow cells and porous calcium phosphate ceramic. *Acta Orthop Scand* 60:334-339, 1989

Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2008 Aug 20;590(1-3):400-8.

Oldham JM, Ma SF, Martinez FJ, Anstrom KJ, Raghu G, Schwartz DA, Valenzi E, Witt L, Lee C, Vij R, Huang Y, Streck ME, Noth I; IPFnet Investigators.. TOLLIP, MUC5B and the Response to N-acetylcysteine Among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Sep 2.

Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1511-3.

Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11002–11007.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8407–8411

Oruqaj G, Karnati S, Vijayan V, Kotarkonda LK, Boateng E, Zhang W, Ruppert C, Günther A, Shi W, Baumgart-Vogt E. Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 21;112(16):E2048-57.

Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, Kotton D, Vacanti JP. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):927-33.

Ouiddir A, Planès C, Fernandes I, VanHesse A, Clerici C. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Dec;21(6):710-8.

Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jul;9(7):532-42.

Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H. Q., Irani, K. & Suzuki, S. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ.* 10, 508–515 (2003).

P

Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, Sawai T. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J.* 2001 Jun;17(6):1220-7. (B)

Pan T, Mason RJ, Westcott JY, Shannon JM. Rat alveolar type II cells inhibit lung fibroblast proliferation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Sep;25(3):353-61. (A)

Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res.* 2011 Apr;157(4):191-9.

Panos RJ, Bak PM, Simonet WS, Rubin JS, Smith LJ. Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest.* 1995 Oct;96(4):2026-33.

Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Mason RJ. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest.* 1993 Aug;92(2):969-77.

Papadimitriou E, Vasilaki E, Vorvis C, Iliopoulos D, Moustakas A, Kardassis D, Stournaras C. Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2012 Jun 7;31(23):2862-75.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):187-97.

Papiris SA, Kagouridis K, Kolilekas L, Papaioannou AI, Roussou A, Triantafillidou C, Baou K, Malagari K, Argentos S, Kotanidou A, Karakatsani A, Manali ED. Survival in Idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations: the non-steroid approach. *BMC Pulm Med.* 2015 Dec 14;15(1):162.

Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells.* 2009 May;2(1):59-68.

Park JS, Park HJ, Park YS, Lee SM, Yim JJ, Yoo CG, Han SK, Kim YW1. Clinical significance of mTOR, ZEB1, ROCK1 expression in lung tissues of pulmonary fibrosis patients. *BMC Pulm Med.* 2014 Oct 31;14:168.

Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014;2014:965849.

Pereira CT, Herndon DN, Rucker R, Jeschke MG. Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression. *J Surg Res*. 2007 May 15;139(2):222-8.

Perlman CE, Bhattacharya J. Alveolar expansion imaged by optical sectioning microscopy. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Sep;103(3):1037-44.

Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, Gavrilov K, Yi T, Zhuang ZW, Breuer C, Herzog E, Niklason LE. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010 Jul 30;329(5991):538-41.

Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):438-46.

Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Matthay MA, Sheppard D. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1537-44.

Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, Clerici C. Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47318-24.

Planès C, Escoubet B, Blot-Chabaud M, Friedlander G, Farman N, Clerici C. Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Oct;17(4):508-18.

Planus E, Galiacy S, Matthay M, Laurent V, Gavrilovic J, Murphy G, Clérici C, Isabey D, Lafuma C, d'Ortho MP. Role of collagenase in mediating in vitro alveolar epithelial wound repair. *J Cell Sci*. 1999 Jan;112 (Pt 2):243-52.

Plataki M, Koutsopoulos AV, Darivianaki K, Delides G, Siafakas NM, Bouros D. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005 Jan;127(1):266-74.

Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Galkina SI, Sukhikh GT, Zorov DB. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp Cell Res*. 2010 Sep 10;316(15):2447-55.

Pociask DA, Sime PJ, Brody AR. Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1. *Lab Invest*. 2004 Aug;84(8):1013-23.

Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*. 2009 Aug 14;284(33):21777-81.

Portnoy J, Pan T, Dinarello CA, Shannon JM, Westcott JY, Zhang L, Mason RJ. Alveolar type II cells inhibit fibroblast proliferation: role of IL-1alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Feb;290(2):L307-16.

Postigo AA1. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J*. 2003 May 15;22(10):2443-52.

Pozharskaya V, Torres-González E, Rojas M, Gal A, Amin M, Dollard S, Roman J, Stecenko AA, Mora AL. Twist: a regulator of epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis. *PLoS One*. 2009 Oct 23;4(10):e7559.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1337-49.

Puthawala K, Hadjiangelis N, Jacoby SC, Bayongan E, Zhao Z, Yang Z, Devitt ML, Horan GS, Weinreb PH, Lukashev ME, Violette SM, Grant KS, Colarossi C, Formenti SC, Munger JS. Inhibition of integrin alpha(v)beta6, an activator of latent transforming growth factor-beta, prevents radiation-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jan 1;177(1):82-90.

Q

Qiao R, Yan W, Clavijo C, Mehrian-Shai R, Zhong Q, Kim KJ, Ann D, Crandall ED, Borok Z. Effects of KGF on alveolar epithelial cell transdifferentiation are mediated by JNK signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Feb;38(2):239-46.

R

Radhakrishnan N, Bhaskaran M, Singhal PC. Hepatocyte growth factor modulates H2O2-induced mesangial cell apoptosis through induction of heme oxygenase-1. *Nephron Physiol*. 2005;101(4):p92-8.

Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151-62.

Raghu G, Brown KK, Costabel U, Cottin V, du Bois RM, Lasky JA, Thomeer M, Utz JP, Khandker RK, McDermott L, Fatenejad S. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Nov 1;178(9):948-55.

Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1985 Feb;131(2):281-9.

Raghu, G., H. R. Collard, et al. (2011). "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management." *Am J Respir Crit Care Med* 183(6): 788-824.

Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, Greening A, MacNee W. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jul;27(1-2):60-8.

Rahman II. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med.* 2005;4(3):175-200.

Rannels DE, Rannels SR. Influence of the extracellular matrix on type 2 cell differentiation. *Chest.* 1989 Jul;96(1):165-73.

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006 May;20(5):847-56.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.* 2005 Jul;25(13):5675-86.

Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, Chen L, Yang XF, Ray A. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):6098-103.

Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem.* 2000 Jan 14;275(2):1439-48.

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb 7;2(2):141-50.

Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014 May 29;370(22):2071-82.

Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittlinger M. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007 May 1;101(1):135-46.

Rock JR, Barkauskas CE, Crouse MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BL. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 27;108(52):E1475-83.

Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:145–152.

Roux J, Kawakatsu H, Gartland B, Pespeni M, Sheppard D, Matthay MA, Canessa CM, Pittet JF. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18579-89.

Ru P, Steele R, Newhall P, Phillips NJ, Toth K, Ray RB. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling. *Mol Cancer Ther*. 2012 May;11(5):1166-73.

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1685-93.

Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3938-44.

Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1007-10.

Ryerson CJ, Cottin V, Brown KK, Collard HR. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm. *Eur Respir J*. 2015 Aug;46(2):512-20.

S

Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Sep;45(3):489-97.

Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40337-44.

Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Postigo A. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res*. 2011;1(7):897-912.

Santiago FM, Bueno P, Olmedo C, Muffak-Granero K, Comino A, Serradilla M, Mansilla A, Villar JM, Garrote D, Ferrón JA. Effect of N-acetylcysteine administration on intraoperative plasma levels of interleukin-4 and interleukin-10 in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2008 Nov;40(9):2978-80.

Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One*. 2009 Aug 4;4(8):e6498.

Sauer UG, Vogel S, Aumann A, Hess A, Kolle SN, Ma-Hock L, Wohlleben W, Dammann M, Strauss V, Treumann S, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomaterial cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Apr 1;276(1):1-20.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):343-54.

Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov;283(5):L922-31.

Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 Nov;29(Pt 6):684-8.

Schupp JC, Binder H, Jäger B, Cillis G, Zissel G, Müller-Quernheim J, Prasse A1. Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2015 Jan 15;10(1):e0116775.

Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*. 2007 Oct;132(4):1311-21.

Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, Fingerlin TE, Zhang W, Gudmundsson G, Groshong SD, Evans CM, Garantziotis S, Adler KB, Dickey BF, du Bois RM, Yang IV, Herron A, Kervitsky D, Talbert JL, Markin C, Park J, Crews AL, Slifer SH, Auerbach S, Roy MG, Lin J, Hennessy CE, Schwarz MI, Schwartz DA. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1503-12.

Selman, M. & Pardo, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir. Res.* 3, 3 (2002).

Semenza GL1. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Aug;19:176-82.

Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Mar-Apr;7(3-4):482-96.

Shan R, Chang L, Li W, Liu W, Rong Z, Chen Y, Zeng L Effects of hyperoxia on cytoplasmic thioredoxin system in alveolar type epithelial cells of premature rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011 Apr;31(2):258-63.

Shannon JM, Pan T, Nielsen LD, Edeen KE, Mason RJ. Lung fibroblasts improve differentiation of rat type II cells in primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Mar;24(3):235-44.

Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjöland H, Billig H. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett*. 2004 Jul 2;569(1-3):293-300.

Shi Y, Wu H, Zhang M, Ding L, Meng F, Fan X. Expression of the epithelial-mesenchymal transition-related proteins and their clinical significance in lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol.* 2013 May 24;8:89.

Smit MA, Geiger TR, Song JY, Gitelman I, Peeper DS. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol Cell Biol.* 2009 Jul;29(13):3722-37.

Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell.* 2010 Nov 24;143(5):802-12.

Song JW, Hong SB, Lim CM, Koh Y, Kim DS. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome. *Eur Respir J.* 2011 Feb;37(2):356-63.

Sowter, H.M., P.J. Ratcliffe, P. Watson, A.H. Greenberg, and A.L. Harris. 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61:6669–6673.

Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):537-44.

Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *Mizgerd JP1. Acute lower respiratory tract infection. N Engl J Med.* 2008 Feb 14;358(7):716-27.

Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA;*103(5):1283-8.

Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2397–2402.

Spragg RG, Bernard GR, Checkley W, Curtis JR, Gajic O, Guyatt G, Hall J, Israel E, Jain M, Needham DM, Randolph AG, Rubenfeld GD, Schoenfeld D, Thompson BT, Ware LB, Young D, Harabin AL. Beyond mortality: future clinical research in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 May 15;181(10):1121-7.

Stern JB, Jaffré S, Dehoux M, Crestani B. [Keratinocyte growth factor and Hepatocyte growth factor: their roles in alveolar epithelial repair]. *Rev Mal Respir.* 2003 Dec;20(6 Pt 1):896-903.

Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Feb;6(2):235-43.

Syrenki L, Chandel NS, Budinger GR, Donnelly HK, Topin J, Eisenbart J, Jovanovic B, Jain M. Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation. *Crit Care Med*. 2007 Mar;35(3):842-8.

Sze SK, de Kleijn DP, Lai RC, Khia Way Tan E, Zhao H, Yeo KS, Low TY, Lian Q, Lee CN, Mitchell W, El Oakley RM, Lim SK. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Oct;6(10):1680-9.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006 Sep;7(9):880-5.

T

Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1377-88.

Takeda K, Cowan A, Fong GH. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation*. 2007 Aug 14;116(7):774-81.

Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov;26(22):8336-46.

Tanaka K, Azuma A, Miyazaki Y, Sato K, Mizushima T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Chest*. 2012 Oct;142(4):1011-9.

Tang TT, Lasky LA. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):30125-35.

Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, Lawson WE. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Oct 1;180(7):657-65.

Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, Ishizaka A. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Apr;10(4):739-53.

Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2010 Mar;51(3):1027-36.

Taylor MS. Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. *Gene*. 2001 Sep 5;275(1):125-32.

Temes E, Martín-Puig S, Acosta-Iborra B, Castellanos MC, Feijoo-Cuaresma M, Olmos G, Aragonés J, Landazuri MO. Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24238-44.

Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, Shu CY, Orimo H. Superoxide anion formation and glutathione metabolism of blood in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Mol Med*. 1995 Jun;55(1):66-70.

Terness P, Bauer TM, Rose L, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002;196:447-457.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.

Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 1997 Jan 1;11(1):72-82.

Titeca G, Goudetsidis L, Laka A, Jardinet D, Poot F. [Rheumatoid neutrophilic dermatitis]. *Ann Dermatol Venereol*. 2014 Oct;141(10):603-6.

Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, McIvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007 Feb;25(2):371-9.

Trinh NT, Privé A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noël J, Brochiero E. Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Oct;293(4):L870-82.

Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7552-7.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrowstromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389-97

Tsui L, Fong TH, Wang IJ. The effect of 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole (YC-1) on cell viability under hypoxia. *Mol Vis*. 2013 Nov 16;19:2260-73. eCollection 2013.

Turchi L, Aberdam E, Mazure N, Pouysségur J, Deckert M, Kitajima S, Aberdam D, Virolle T. Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell Death Differ*. 2008 Sep;15(9):1472-80.

Tzouvelekis A, Harokopos V, Pappas T, Oikonomou N, Chatziioannou A, Vilaras G, Tsiambas E, Karameris A, Bouros D, Aidinis V. Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1alpha in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 1;176(11):1108-19.

U

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006 Oct;36(10):2566-73.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36.

Uhal, B. D. et al. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am. J. Physiol.* 275, L1192–1199 (1998).

Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest.* 1994 Mar;93(3):1298-306.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ (2015) Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015

V

Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.* 2005 Apr;16(4):1987-2002.

Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenovich D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):424-30.

Valeyre, D., O. Freynet, et al. (2010). "[Epidemiology of interstitial lung diseases]." *Presse Med* 39(1): 53-59.

Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002 Jan;9(1):20-6.

Vande Velde, C., J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem, and A.H. Greenberg. 2000. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.* 20:5454–5468.

Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood.* 2001 Jul 15;98(2):296-302.

Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004 May 15;18(10):1131-43.

Vela L, Gonzalo O, Naval J, Marzo I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem.* 2013 Feb 15;288(7):4935-46.

Verghese GM, Ware LB, Matthay BA, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport and the resolution of clinically severe hydrostatic pulmonary edema. *J Appl Physiol* (1985). 1999 Oct;87(4):1301-12.

Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. *J Cell Sci*. 2014 Jan 15;127(Pt 2):261-6.

Vyas-Read S, Shaul PW, Yuhanna IS, Willis BC. Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jul;293(1):L212-21.

W

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639– 648.

Walbrecq G, Wang B, Becker S, Hannotiau A, Fransen M, Knoops B. Antioxidant cytoprotection by peroxisomal peroxiredoxin-5. *Free Radic Biol Med*. 2015 Jul;84:215-26.

Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):321-32.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4. A

Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jul 17;212(2):550-6. B

Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993 Oct 15;268(29):21513-8. A

Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 1993 Dec 15;82(12):3610-5. B

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*. 2014 Sep;1(1):87-105.

Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, Liu F, Ifedigbo E, Xu X, Oury TD, Kaminski N, Choi AM. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2006 Dec 25;203(13):2895-906.

Wang Y, Feinstein SI, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme: protection of lung alveolar epithelial type II cells from H₂O₂-induced oxidative stress. *J Cell Biochem*. 2008 Jul 1;104(4):1274-85.

Wang Y, Huang C, Reddy Chintagari N, Bhaskaran M, Weng T, Guo Y, Xiao X, Liu L. miR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/ β -catenin pathway. *Nucleic Acids Res*. 2013 Apr 1;41(6):3833-44.

Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytherapy*. 2005;7(6):509-19.

Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, DiMaio JM, Kinch LN, Grishin NV, Garcia CK. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet*. 2009 Jan;84(1):52-9.

Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 May;163(6):1376-83.

Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1334-49.

Weiss DJ, Bertonecello I, Borok Z, Kim C, Panoskaltzis-Mortari A, Reynolds S, Rojas M, Stripp B, Warburton D, Prockop DJ. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Jun;8(3):223-72.

Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest*. 2013 Jun;143(6):1590-8.

Weiss DJ. Cell therapies for ARDS: a promising start. *Lancet Respir Med*. 2015 Jan;3(1):2-3.

Weng T, Poth JM, Karmouty-Quintana H, Garcia-Morales LJ, Melicoff E, Luo F, Chen NY, Evans CM, Bunge RR, Bruckner BA, Loebe M, Volcik KA, Eltzschig HK, Blackburn MR. Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Dec 15;190(12):1402-12.

Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Mar;300(3):C385-93.

Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:371-93.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2260-8.

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2005 May;166(5):1321-32.

Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, Caballero L, McMillan M, Fang X, Cosgrove K, Vojnik R, Calfee CS, Lee JW, Rogers AJ, Levitt J, Wiener-Kronish J, Bajwa EK, Leavitt A, McKenna D, Thompson BT, Matthay MA. Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Jan;3(1):24-32.

Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 May;349(2):209-20.

Wong CK, Lam CW, Wu AK, Ip WK, Lee NL, Chan IH, Lit LC, Hui DS, Chan MH, Chung SS, Sung JJ. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2004 Apr;136(1):95-103.

Wright, JR, "Metabolism and turnover of lung surfactant", *Am Rev. Respir, Dis*, 1987 ; 136 ; 426.

Wu S, Kasisomayajula K, Peng J, Bancalari E. Inhibition of JNK enhances TGF-beta1-activated Smad2 signaling in mouse embryonic lung. *Pediatr Res*. 2009 Apr;65(4):381-6.

Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*. 2006 Apr;16(4):189-97.

Wu Y, Zhao RC. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem Cell Rev*. 2012 Mar;8(1):243-50.

X

Xiang L, Gilkes DM, Hu H, Luo W, Bullen JW, Liang H, Semenza GL. HIF-1 α and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015 May 20;6(14):11768-78.

Xie L, Pi X, Wang Z, He J, Willis MS, Patterson C. Depletion of PHD3 protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Mar;80:156-65.

Xu YD, Hua J, Mui A, O'Connor R, Grotendorst G, Khalil N. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Sep;285(3):L527-39.

Y

Yaekashiwa M, Nakayama S, Ohnuma K, Sakai T, Abe T, Satoh K, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi T, Nukiwa T. Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Dec;156(6):1937-44.

Yanai H, Shteinberg A, Porat Z, Budovsky A, Braiman A, Zeische R, Fraifeld VE. Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Aging (Albany NY)*. 2015 Sep;7(9):664-72.

Yáñez-Mó M, Siljander PR, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 14;4:27066.

Yang J, Dai C, Liu Y A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jan;16(1):68-78.

Yang J, Velikoff M, Agarwal M, Disayabutr S, Wolters PJ, Kim KK. Overexpression of inhibitor of DNA-binding 2 attenuates pulmonary fibrosis through regulation of c-Abl and Twist. *Am J Pathol.* 2015 Apr;185(4):1001-11. (A)

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008 Jun;14(6):818-29. (B)

Yang JX, Zhang N, Wang HW, Gao P, Yang QP, Wen QP. CXCR4 receptor overexpression in mesenchymal stem cells facilitates treatment of acute lung injury in rats. *J Biol Chem.* 2015 Jan 23;290(4):1994-2006. (B)

Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008 Mar;10(3):295-305. A

Yang S, Banerjee S, de Freitas A, Sanders YY, Ding Q, Matalon S, Thannickal VJ, Abraham E, Liu G. Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2012 Feb;180(2):484-93.

Yang T, Chen M, Sun T. Simvastatin attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31(6):863-74.

Yano T, Deterding RR, Simonet WS, Shannon JM, Mason RJ. Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Oct;15(4):433-42.

Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003 Aug 14;549(1-3):105-9.

Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Apr 2;95(7):516-25.

Ylöstalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells.* 2012 Oct;30(10):2283-96.

Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int.* 1998 Oct;54(4):1128-38.

Yoshihara T, Hamamoto T, Munakata R, Tajiri R, Ohsumi M, Yokota S. Localization of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells: biochemical and immunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1123-1131.

Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol.* 1998 Oct;275(4 Pt 1):L818-26.

Yu H, Königshoff M, Jayachandran A, Handley D, Seeger W, Kaminski N, Eickelberg O. Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis. *FASEB J*. 2008 Jun;22(6):1778-89.

Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):15911-6.

Z

Zabner J, Winter M, Excoffon KJ, Stoltz D, Ries D, Shasby S, Shasby M. Histamine alters E-cadherin cell adhesion to increase human airway epithelial permeability. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Jul;95(1):394-401.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):964-8.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1429-37.

Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8094-100.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23337-47.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug 1;33(3):337-49.

Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 May;40(5):519-35.

Zha S, Sekiguchi J, Brush JW, Bassing CH, Alt FW. Complementary functions of ATM and H2AX in development and suppression of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 8;105(27):9302-6.

Zhang HT, Fang SC, Wang CY, Wang W, Wu J, Wang C, Xu B, Zhang YM. MMP-9 1562C>T Gene Polymorphism and Efficacy of Glucocorticoid Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015 Sep 24.

Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Dec;21(6):658-65.

Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1995 Aug;147(2):352-61.

Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 1994 Jul;145(1):114-25.

Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y, Jiang Y, Shen J, Liu J, Wang Q, Zhu J, Feng X, Dong J, Qian C. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Mar 9;13:108.

Zhang L, Li L, Liu H, Prabhakaran K, Zhang X, Borowitz JL, Isom GE. HIF-1 α activation by a redox-sensitive pathway mediates cyanide-induced BNIP3 upregulation and mitochondrial-dependent cell death. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jul 1;43(1):117-27.

Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas P Jr, Datto MB, Frederick JP, Wang XF, Warburton D. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Mar;282(3):L585-93.

Zhou G, Dada LA, Wu M, Kelly A, Trejo H, Zhou Q, Varga J, Sznajder JI. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Dec;297(6):L1120-30.

Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, Qu JM, Matthay MA, Lee JW. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells.* 2014 Jan;32(1):116-25

Zhuo W1, Liao L, Fu Y, Xu T, Wu W, Yang S, Tan J. Efficiency of endovenous versus arterial administration of mesenchymal stem cells for ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Transplant Proc.* 2013 Mar;45(2):503-10.

Ziel KA, Campbell CC, Wilson GL, Gillespie MN. Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene. *FASEB J.* 2004 Jun;18(9):986-8.

Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 2003 Jun;17(6):1146-9.